



Mafalda da Silva Fernandes

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Co-Orientadores: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL

João Paulo Borges, PhD, FCT-UL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutora Patrícia Maria Cristovam Cipriano Almeida de Carvalho

Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2011



Mafalda da Silva Fernandes

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Co-Orientadores: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL

João Paulo Borges, PhD, FCT-UL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutora Patrícia Maria Cristovam Cipriano Almeida de Carvalho

Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2011

Copyright

Copyright© - Todos os direitos reservados. Mafalda da Silva Fernandes; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; Universidade Nova de Lisboa.

Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, Professora Célia Henriques e Professor Jorge Silva, do grupo GREAT, pela orientação, apoio e ajuda, que me permitiram a realização deste trabalho. Agradeço a sua total disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida, a qualquer hora, e os seus conselhos.

Aos meus pais, Orlando e Filomena, pelo apoio incondicional, por acreditarem sempre em mim e me incentivarem a continuar e a nunca desistir dos meus objectivos.

Aos meus colegas de laboratório, Anita, João (Gémeo) e Joana, que me acompanharam desde o início, pelo bom ambiente que se gerou no laboratório, o espírito de alegria e entreaajuda e a boa disposição, que fizeram com que este percurso fosse, certamente, mais agradável.

Ao Professor João Paulo Borges, do grupo CENIMAT, e meu co-orientador, pelo apoio na realização dos ensaios de tracção e na obtenção das imagens de SEM.

À Professora Marise Almeida, da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, a sua colaboração, sem a qual não teria sido possível realizar os testes de degradação. Agradeço o tempo e material que me disponibilizou, os conselhos e toda a ajuda.

À Professora Alexandra Fernandes e à Ana Silva, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, a colaboração que tornou possível a realização dos testes de culturas celulares.

À Doutora Luísa Botelho, do ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear), que tornou possível a esterilização das amostras com radiação gama.

Ao Professor João Sottomayor, do grupo REQUIMTE, por me ter explicado e permitido a utilização do aparelho de medição de ângulos de contacto.

Ao meu namorado, Sérgio, por nunca me deixar desistir nem desanimar perante as dificuldades. Obrigada por todo o carinho, amizade, amor, compreensão, apoio e inesgotável paciência.

Resumo

Em estomatologia, são utilizadas membranas oclusivas na regeneração de tecidos periodontais e na reparação de defeitos ósseos, nomeadamente em tratamentos de regeneração tecidual guiada (GTR) e de regeneração óssea guiada (GBR). Este trabalho teve como objectivo a produção de membranas biodegradáveis para este fim.

Através da técnica de electrofiação, foram obtidas membranas a partir de soluções de policaprolactona (PCL) com quitosano (CS) disperso. A fiação simultânea de duas soluções permitiu produzir membranas, resistentes mecanicamente, com diferentes proporções CS:PCL. Algumas membranas foram sujeitas a tratamentos com hidróxido de sódio (NaOH) e esterilização por irradiação gama.

As propriedades físico-químicas e biológicas das membranas foram analisadas através de microscopia electrónica de varrimento, medição de ângulos de contacto, ensaios de tracção e testes *in vitro*. Os ângulos de contacto mostraram um aumento da hidrofiliabilidade das membranas com o tratamento de NaOH. Os ensaios de tracção revelaram que o aumento de CS provoca uma diminuição no módulo de Young e que todas as membranas possuem uma elevada extensão à ruptura, evidenciando estabilidade mecânica, adequada aos procedimentos estomatológicos. As membranas permanecem estáveis à degradação enzimática e ao meio fisiológico por um período adequado à regeneração dos tecidos. A imersão em SBF (*Simulated Body Fluid*) revelou que as membranas possuem alguma bioactividade, que melhora com o tratamento com NaOH. Os testes de culturas celulares revelaram que ocorreu adesão celular em todas as membranas produzidas.

Palavras-chave: electrofiação, policaprolactona, quitosano, regeneração tecidual guiada, regeneração óssea guiada.

Abstract

In dental practice, occlusive membranes are used as a barrier to prevent soft tissue ingrowth and create space for slowly regenerating periodontal and bony tissues. The aim of this work was to produce biodegradable membranes for guided tissue regeneration (GTR) and guided bone regeneration (GBR).

Different types of membranes were obtained by the electrospinning technique, from solutions of polycaprolactone (PCL) with dispersed chitosan (CS) particles. The simultaneous spinning of two solutions allowed the production of membranes, mechanically stable, with different proportions CS:PCL. Some membranes were subjected to a treatment with sodium hydroxide (NaOH) and sterilized by gamma irradiation.

The physico-chemical and biological properties of the membranes were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), contact angle measurement, tensile tests and *in vitro* tests. The contact angles showed an increase in hydrophilicity of the membranes with NaOH treatment. The tensile tests revealed a decrease in Young's modulus with an increase of CS content and that all membranes have a high strain at break, indicating a mechanical stability, suitable for dental procedures. The membranes are stable when subjected to a medium with enzymatic activity and under physiological simulated conditions during the time period required for the regeneration of the tissues. A simulated body fluid (SBF) immersion test revealed some bioactivity, which improves with the treatment with NaOH. Cell cultures revealed that cell adhesion occurred in all membranes produced.

Keywords: electrospinning, polycaprolactone, chitosan, guided tissue regeneration, guided bone regeneration.

Índice

| | |
|--|--------------|
| AGRADECIMENTOS | VII |
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | XI |
| ÍNDICE | XIII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XV |
| ÍNDICE DE TABELAS | XVII |
| LISTA DE ACRÓNIMOS | XIX |
| LISTA DE SÍMBOLOS | XXI |
| ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS | XXIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 DENTE E TECIDOS ADJACENTES | 1 |
| 1.2 MEMBRANAS PARA USO ESTOMATOLÓGICO | 2 |
| 1.2.1 Doença periodontal..... | 3 |
| 1.2.2 GTR e GBR | 3 |
| 1.2.3 Tipos de membranas | 4 |
| 1.2.4 Propriedades das membranas..... | 5 |
| 1.2.5 Degradação das membranas em ambiente oral..... | 7 |
| 1.3 ELECTROFIAÇÃO | 8 |
| 1.3.1 Configuração e mecanismos | 9 |
| 1.4 BIOMATERIAIS: POLÍMEROS | 13 |
| 1.4.1 Policaprolactona | 13 |
| 1.4.2 Quitosano..... | 16 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 2.1 MATERIAIS..... | 19 |
| 2.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS..... | 19 |
| 2.2.1 Preparação das soluções | 19 |
| 2.2.2 Montagem dos sistemas de electrofiação..... | 19 |
| 2.2.3 Electrofiação..... | 20 |
| 2.3 TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO | 24 |
| 2.4 CARACTERIZAÇÃO | 24 |
| 2.4.1 Morfologia das fibras..... | 24 |
| 2.4.2 Porosidade das membranas..... | 24 |
| 2.5 MEDIÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO | 25 |
| 2.6 ESTERILIZAÇÃO COM RADIAÇÃO GAMA | 26 |
| 2.7 ENSAIOS DE TRACÇÃO | 28 |
| 2.8 TESTES DE DEGRADAÇÃO | 30 |
| 2.8.1 Meio ácido | 30 |
| 2.8.2 pH fisiológico | 30 |
| 2.8.3 Meio enzimático | 30 |
| 2.9 TESTES DE BIOACTIVIDADE | 31 |
| 2.10 CULTURAS CELULARES | 32 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 3.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO | 35 |
| 3.1.1 Concentração da solução de PCL | 35 |
| 3.1.2 Tensão aplicada | 36 |
| 3.1.3 Fluxo..... | 37 |
| 3.1.4 Deposição conjunta..... | 39 |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.1 | Morfologia das fibras..... | 40 |
| 3.2.2 | Porosidade das membranas..... | 42 |
| 3.3 | ÂNGULOS DE CONTACTO | 43 |
| 3.4 | ENSAIOS DE TRACÇÃO | 47 |
| 3.5 | TESTES DE DEGRADAÇÃO | 52 |
| 3.6 | TESTES DE BIOACTIVIDADE | 56 |
| 3.7 | CULTURAS CELULARES | 58 |
| 4 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS | 61 |
| | BIBLIOGRAFIA | 63 |
| | ANEXO 1 | 67 |
| | ANEXO 2 | 69 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Anatomia de um dente saudável. | 1 |
| Figura 1.2 Estágios da doença periodontal. | 3 |
| Figura 1.3 Aplicação de uma membrana para GTR. | 4 |
| Figura 1.4 Funcionamento de uma membrana para GTR. | 6 |
| Figura 1.5 Configuração básica para electrofiação. | 9 |
| Figura 1.6 Representação esquemática do processo de electrofiação. | 10 |
| Figura 1.7 Representação esquemática da formação dos cones de Taylor. | 10 |
| Figura 1.8 Evolução do enrolamento e estiramento do jacto. | 11 |
| Figura 1.9 Região de instabilidade de um jacto de uma solução aquosa de PEO. | 11 |
| Figura 1.10 Obtenção da policaprolactona. | 14 |
| Figura 1.11 Ligação éster. | 16 |
| Figura 1.12 Hidrólise e metabolismo dos produtos de degradação do PCL. | 16 |
| Figura 1.13 Copolímero com k unidades acetilglucosamina e (n-k) unidades glucosamina. | 17 |
| Figura 2.1 Sistema de electrofiação utilizado na produção das membranas. | 20 |
| Figura 2.2 Detalhe do sistema de electrofiação utilizado na produção das membranas de PCL e quitosano. | 22 |
| Figura 2.3 Membrana 10% CS. | 22 |
| Figura 2.4 Caracterização das superfícies segundo o ângulo de contacto. | 26 |
| Figura 2.5 Aparelho utilizado nas medições dos ângulos de contacto (KSV CAM 101). | 26 |
| Figura 2.6 Unidade experimental de irradiação de ⁶⁰ Co – Precisa 22 ML. | 27 |
| Figura 2.7 Posição dos dosímetros. | 27 |
| Figura 2.8 Comportamento mecânico de uma amostra de PEO ao ser traccionada. | 29 |
| Figura 2.9 Curva de tracção. | 29 |
| Figura 3.1 Imagens de MO das fibras produzidas a partir das soluções 8% PCL e de 12% PCL, para uma distância de 25 cm e um fluxo 0,5 ml/h. | 36 |
| Figura 3.2 Imagens de MO das fibras produzidas a partir de uma solução 12% PCL, para diferentes fluxos. | 37 |
| Figura 3.3 Imagens de MO das fibras produzidas a partir de uma solução 12% PCL + 1% CS, para diferentes fluxos. | 39 |
| Figura 3.4 Imagens de MO das deposições duplas. | 40 |
| Figura 3.5 Imagem de SEM da membrana de PCL, ampliação 1000x. | 40 |
| Figura 3.6 Imagens de SEM (ampliação 50x) das membranas 10% CS e 20% CS. | 41 |
| Figura 3.7 Imagem de SEM (ampliação 50x) da membrana 10% CS tratada com uma solução NaOH 5M, durante 2 horas. | 42 |
| Figura 3.8 Diminuição dos ângulos de contacto com o tratamento NaOH 5 M. | 45 |
| Figura 3.9 Diferentes tempos de tratamento com solução NaOH 5 M na membrana 10% CS. | 46 |
| Figura 3.10 Curvas de tensão-deformação das amostras de PCL. | 48 |
| Figura 3.11 Curvas de tensão-deformação das amostras 10% CS. | 48 |
| Figura 3.12 Curvas de tensão-deformação das amostras 20% CS. | 49 |
| Figura 3.13 Módulos de Young da membrana 10% CS. | 52 |
| Figura 3.14 Imagens de SEM (ampliação 200x) da membrana 20% CS antes e depois dos testes de degradação. | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.15 Imagens de SEM (ampliação 1000x) da membrana de PCL antes e depois dos testes de degradação..... | 54 |
| Figura 3.16 Imagens de SEM da membrana PCL e da membrana PCL tratada com NaOH, após imersão em SBF..... | 57 |
| Figura 3.17 Imagens de SEM das membranas 10% CS e 20% CS, após 30 dias de imersão em SBF. | 58 |
| Figura 3.18 Imagens de microscopia confocal de fluorescência, de contraste de fase e de sobreposição das culturas celulares nas membranas. | 59 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 Descrição dos equipamentos utilizados nas montagens de electrofiação..... | 20 |
| Tabela 2.2 Resumo sobre a produção das membranas produzidas neste trabalho. | 23 |
| Tabela 2.3 Dose total recebida por cada dosímetro no período de 11h20..... | 28 |
| Tabela 2.4 Protocolo para a preparação de 1 L de solução SBF e comparação entre as quantidades de vários iões na solução e no plasma humano. | 31 |
| | |
| Tabela 3.1 Densidade aparente e porosidade das membranas produzidas. | 42 |
| Tabela 3.2 Ângulos de contacto das três membranas produzidas. | 43 |
| Tabela 3.3 Ângulos de contacto antes e após tratamento (1 hora) com NaOH 5 M. | 44 |
| Tabela 3.4 Diferentes tempos de tratamento com solução NaOH 5 M na membrana 10% CS. | 45 |
| Tabela 3.5 Módulos de Young das membranas..... | 50 |
| Tabela 3.6 Módulos de Young das membranas antes e depois dos tratamentos. | 51 |
| Tabela 3.7 Perda de massa das membranas..... | 52 |
| Tabela 3.8 Influência da esterilização com radiação gama na taxa de degradação do PCL..... | 55 |
| | |
| Tabela 1 Medições referentes às amostras utilizadas nos cálculos das porosidades. | 69 |

Lista de acrónimos

| | |
|--------|---|
| CS | Quitosano (do inglês <i>Chitosan</i>) |
| DP | Desvio Padrão |
| e-PTFE | Politetrafluoretileno expandido (do inglês <i>Expanded Polytetrafluoroethylene</i>) |
| GBR | Regeneração óssea guiada (do inglês <i>Guided Bone Regeneration</i>) |
| GTR | Regeneração tecidual guiada (do inglês <i>Guided Tissue Regeneration</i>) |
| LP | Ligamento Periodontal |
| MO | Microscópio Óptico |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| PCL | Policaprolactona (do inglês <i>Polycaprolactone</i>) |
| PEO | Poli(óxido de etileno) (do inglês <i>Poly(ethylene oxide)</i>) |
| PGA | Poli(ácido glicólico) (do inglês <i>Poly(glycolic acid)</i>) |
| PLA | Poli(ácido láctico) (do inglês <i>Poly(lactic acid)</i>) |
| SBF | <i>Simulated Body Fluid</i> |
| SEM | Microscópio electrónico de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscope</i>) |

Lista de símbolos

| | |
|---------------|---|
| % (m/m) | Percentagem massa/massa |
| % (m/v) | Percentagem massa/volume |
| Φ | Fluxo (ou caudal) |
| A | Área |
| v | Velocidade |
| d | Diâmetro |
| σ | Tensão |
| E | Módulo de Young (ou módulo de elasticidade) |
| ε | Deformação |
| ρ | Densidade |
| m | Massa |
| V | Volume |
| e | Espessura |

Enquadramento e Objectivos

O presente trabalho enquadra-se no Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, tendo como principal objectivo a produção de membranas de policaprolactona (PCL) e quitosano (CS) para aplicação estomatológica. Para além da produção das membranas, este trabalho tem também como objectivo fazer a sua caracterização, quer do ponto de vista físico, através de testes mecânicos e imagens de SEM, quer do ponto de vista biológico, através de testes de degradação, testes de bioactividade em SBF (*Simulated Body Fluid*) e culturas celulares.

Em estomatologia, as membranas são usadas como uma barreira para evitar a invasão de tecidos moles para o interior da cavidade óssea, resultante de uma extracção dentária ou devido a doença periodontal, e criar espaço para a regeneração de tecidos periodontais. De uma forma geral, as membranas disponíveis actualmente são feitas de polímeros, incluindo o PTFE (politetrafluoretileno), que não é biodegradável, e poliésteres, como o PGA (poli(ácido glicólico)) e o PLA (poli(ácido láctico)), ou à base de colagénio. As membranas à base de poliésteres são biodegradáveis e são mais fáceis de manipular durante a cirurgia em comparação com as membranas não-reabsorvíveis, mas possuem uma fraca resposta celular. As membranas de colagénio, por outro lado, têm mostrado bons resultados a nível da sua capacidade regenerativa devido à sua afinidade celular e excelente biocompatibilidade, mas demonstram uma grande instabilidade a nível mecânico, devido à sua rápida degradação e colapso precoce. Estas desvantagens tornam evidente que a membrana periodontal ideal ainda não foi encontrada. Toda a membrana deve apresentar uma boa tolerância biológica e bioreabsorção adequada, juntamente com um bom desempenho mecânico.

Na última década, inúmeros investigadores têm tentado desenvolver uma membrana periodontal com as propriedades e características necessárias. A electrofiação apresenta-se como uma nova alternativa para produção destas membranas. As membranas de nanofibras obtidas por esta técnica possuem características desejáveis para aplicações na área da saúde, tais como os seus diâmetros reduzidos (que vão até à escala nanométrica) e estrutura porosa, que demonstram grande influência no comportamento celular. O presente trabalho pretende explorar a produção de membranas para aplicação estomatológica obtidas através da electrofiação de PCL, que é um polímero biodegradável e biocompatível, como alternativa às membranas actualmente em uso clínico.

1 Introdução

1.1 Dente e tecidos adjacentes

O dente apresenta três zonas distintas: a coroa (porção acima da gengiva), o colo (zona de transição) e a raiz (implantada no osso alveolar). Externamente, na zona da coroa, o dente é coberto por uma substância mineralizada, o esmalte. Abaixo dele surge a dentina, substância de origem óssea que forma a maior parte do dente, seguindo-se, no seu interior, a polpa dentária, tecido mole e altamente vascularizado e enervado. A raiz é coberta por um material que promove a adesão do dente, o cimento, que pode ser regenerado, ao contrário do que acontece com o esmalte.

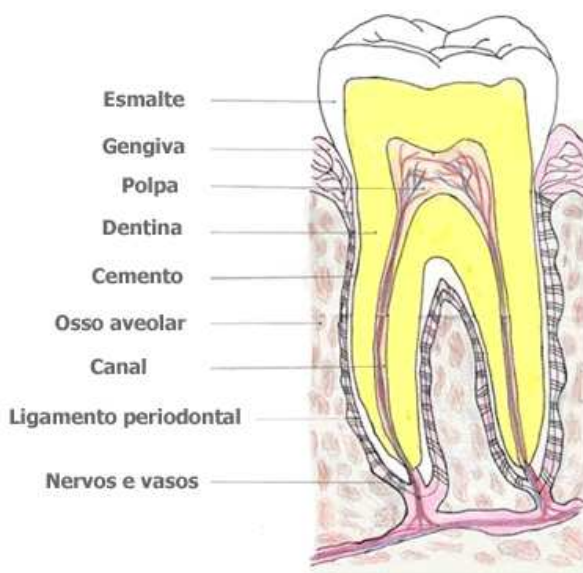


Figura 1.1 Anatomia de um dente saudável.

O periodonto inclui todos os tecidos envolvidos na fixação do dente ao osso (mandíbula, no caso do maxilar inferior, ou maxila, no caso do maxilar superior). Estes tecidos incluem a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar (Figura 1.1). Ao falar da regeneração periodontal, é importante compreender que cada um dos componentes do periodonto tem uma estrutura muito especializada e que estas características estruturais definem directamente a sua função:

Gengiva – Faz parte dos tecidos moles de revestimento da boca. É uma estrutura fibrosa de tecido conjuntivo, que confere firmeza à gengiva, coberta por uma camada epitelial. A

gingiva envolve o dente, cobre o osso alveolar e tem como principal função proteger os tecidos subjacentes.

Ligamento periodontal (LP) – É uma estrutura fibrosa de tecido conjuntivo, com componentes nervosos e vasculares, que une a superfície da raiz do dente, nomeadamente o cimento, ao osso alveolar. As fibras do LP ajudam o dente a suportar as forças de compressão que ocorrem durante a mastigação e ajudam a mantê-lo inserido no osso. Comparados com a maioria dos outros ligamentos do corpo, são altamente vascularizados. Não existem actualmente biomateriais artificiais que possam ser utilizados para substituir ou reparar as fibras altamente regulares e orientadas do LP. Assim, a regeneração oferece a única abordagem para restaurar o ligamento periodontal. [1]

Cimento – É um tecido mineralizado especializado que cobre a superfície da raiz do dente. É outro componente essencial do periodonto e é um tecido conjuntivo avascular. Apesar do cimento ser anatomicamente parte integrante do dente, funcionalmente é um componente do periodonto e o seu papel principal é servir como local de fixação para as fibras de colagénio do ligamento periodontal. [1]

Osso alveolar – É a porção do osso de suporte (mandíbula ou maxila) que contém os alvéolos dentários. O conteúdo mineral do osso alveolar é principalmente a hidroxiapatite, que também é encontrada no esmalte dentário como a principal substância inorgânica. O osso alveolar é composto por uma zona externa de osso cortical, a zona interna de osso espesso e compacto e uma zona intermédia de osso esponjoso ou trabeculado. [1]

1.2 Membranas para uso estomatológico

Em estomatologia é desejável evitar a perda óssea e a formação de tecidos moles, nomeadamente gengiva, na cavidade óssea resultante de uma extracção dentária ou devido a doença periodontal. A invasão de tecidos moles para o interior da cavidade compromete a regeneração óssea e a colocação de próteses, essenciais para a recuperação da função de mastigação, da fala e da estética facial.

Duas abordagens cirúrgicas, conhecidas como regeneração tecidual guiada (GTR) e regeneração óssea guiada (GBR), têm sido cada vez mais utilizadas na reparação e regeneração tanto da estrutura como da função dos tecidos periodontais danificados. Em ambos os casos, uma membrana periodontal oclusiva actua como uma barreira para evitar que os tecidos

epiteliais e conjuntivo da gengiva, que se regeneram de forma relativamente rápida, cresçam numa área em que o outro tipo de tecido, com um crescimento mais lento, como o tecido ósseo, é desejado. [2]

1.2.1 Doença periodontal

A doença periodontal, ou periodontite, é uma patologia muito agressiva que pode levar à destruição do periodonto. Esta infecção, de origem bacteriana, se não for devidamente tratada, dá origem a bolsas periodontais entre a gengiva e a raiz dos dentes, com perda óssea e contínua migração apical do epitélio (Figura 1.2). Por fim, o tecido conjuntivo dos dentes e da gengiva começa a decompor-se, causando a perda dos dentes. Embora a base do tratamento bem sucedido comece com o estabelecimento de uma boa higiene oral, seguida de uma limpeza profissional (remoção da placa bacteriana e tártaro pelo dentista/higienista) para controlar a inflamação e impedir a perda óssea progressiva, em casos mais avançados é necessária cirurgia. Esta pode incluir o corte e afastamento da gengiva para permitir que as bactérias e placa bacteriana possam ser raspadas e retiradas da superfície radicular. [3]



Figura 1.2 Estágios da doença periodontal. (1) Dente e gengivas saudáveis; (2) Início da doença (gingivite): as gengivas estão vermelhas, inchadas e sangram com facilidade; primeiros sinais de depósitos na raiz do dente; (3) Periodontite: gengivas estão muito vermelhas e dolorosas; sangram com facilidade. Muitos depósitos na raiz do dente. Destruição do periodonto. [3]

1.2.2 GTR e GBR

No tratamento da doença periodontal podem ser colocadas membranas que contribuem para a correcta regeneração dos tecidos periodontais. Nestes tratamentos de regeneração tecidual guiada (GTR), os tecidos conjuntivo e epitelial da gengiva, de crescimento mais rápido, são impedidos de migrar, pela membrana, para a zona afectada. O espaço entre a membrana e o osso é preservado, dando tempo para o ligamento periodontal e o osso alveolar repovoarem a área do defeito (Figura 1.3). A membrana pode ser utilizada sozinha ou em conjunto com um enxerto ou substituto ósseo. Embora as técnicas de GTR tenham alcançado sucesso em determinadas

situações clínicas, os resultados são variáveis, dependendo de múltiplos factores, tais como o tamanho e tipo de defeito, idade do paciente ou habilidade do operador/cirurgião. [1, 3]

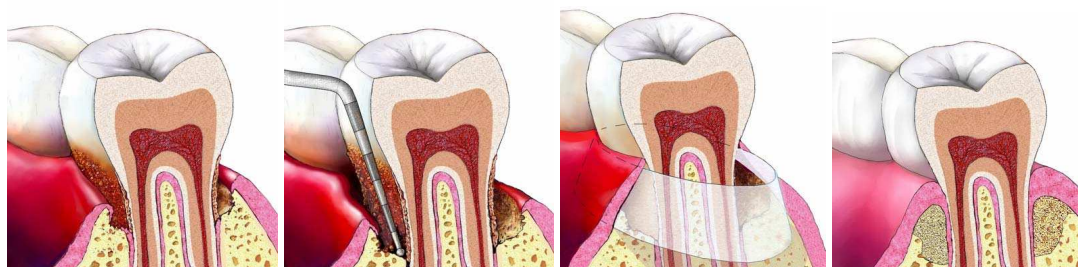


Figura 1.3 Aplicação de uma membrana para GTR. (a) Acumulação de placa bacteriana; (b) Limpeza: remoção da placa bacteriana; (c) Colocação da membrana, servindo de barreira entre a gengiva e a zona de defeito ósseo; (d) Regeneração completa da zona afectada, com total reabsorção da membrana. [3]

Semelhante ao conceito de GTR, a regeneração óssea guiada (GBR) é aplicada em locais de implante dentário. Nestes casos, a membrana é usada para cobrir um defeito ósseo, de forma a estimular o crescimento ósseo e evitar o crescimento de tecido fibroso no local. Na origem do defeito ósseo pode estar a perda ou extracção de um dente. Nestes casos, uma grande porção de osso alveolar, que antes rodeava a raiz do dente, pode desaparecer. Essa perda óssea é descrita como "a reabsorção óssea". Para algumas pessoas, a perda óssea após a remoção ou perda de dentes é de tal maneira, que o osso se torna insuficiente para garantir a correcta colocação de um implante. A regeneração óssea guiada pode ser usada para induzir o crescimento ósseo nestas áreas, antes de colocar os implantes dentários, ou para reparar defeitos em torno de implantes dentários colocados previamente. [3, 4]

A cavidade cirúrgica pode ainda ser preenchida com diferentes tipos de materiais, antes de cobrir a área com uma membrana de barreira. Podem ser usados para este fim: ossos de animais, devidamente tratados; osso sintético e polímeros biocompatíveis.

1.2.3 Tipos de membranas

As membranas utilizadas como barreira em uso estomatológico têm sido obtidas a partir de uma variedade de fontes, tanto naturais como sintéticas, e são hoje em dia comercializadas sob diferentes nomes comerciais ou marcas.

As primeiras membranas desenvolvidas e aprovadas para uso clínico foram do tipo não-reabsorvível, isto é, exigiam uma segunda cirurgia para remoção da membrana, 4 a 6 semanas após a sua colocação. Devido à sua integridade estrutural inerente, permanecem estáveis durante todo o seu tempo *in situ*. No entanto, para além de possíveis complicações e do desconforto

associados ao necessário segundo procedimento cirúrgico, no caso da membrana ficar exposta, é necessária uma remoção prematura, de forma a evitar uma possível infecção. Estas desvantagens levaram ao desenvolvimento de membranas reabsorvíveis. [5]

As membranas não-reabsorvíveis de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) foram utilizadas pela primeira vez por volta de 1984. Estas membranas são biocompatíveis e não provocam infecções. Foram consideradas o padrão para membranas deste tipo e com elas foram obtidos excelentes resultados. As membranas reabsorvíveis são hoje em dia as mais utilizadas, embora as membranas de e-PTFE ainda sejam usadas em certas situações clínicas, que exijam uma membrana mais estável. [6-8]

Uma grande variedade de membranas reabsorvíveis está actualmente disponível como alternativa às convencionais membranas não-reabsorvíveis. Estas membranas são geralmente à base de poliésteres, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros ou de tecido derivado de colagénio. As membranas à base de poliésteres são biodegradáveis (são gradualmente hidrolisadas ou degradadas por acção enzimática), permitem a integração dos tecidos e são mais fáceis de lidar cirurgicamente em comparação com as membranas não-reabsorvíveis. No entanto, a fraca resposta celular destas membranas é uma grande desvantagem, perturbando a regeneração dos tecidos de interesse. As membranas de colagénio, por outro lado, têm mostrado bons resultados a nível da sua capacidade regenerativa devido à sua afinidade celular e excelente biocompatibilidade. No entanto, as membranas à base de colagénio mostram uma pobre estabilidade mecânica e dimensional, devido à sua rápida degradação e colapso precoce. [2]

De uma forma geral, as membranas disponíveis actualmente a nível comercial para GTR/GBR são feitas de polímeros, incluindo: PTFE – **Gore-Tex**[®] (W.L. Gore & Associates, Inc., Elkton, MD, EUA) e **TefGen**[®] (Lifecore Biomedical, LLC, Chaska, MN, EUA), PLA – **Guidor**[®] (Guidor AB, Huddinge, Suécia), PGA – **Inion**[®] (Inion Oy, Tampere, Finlândia), policarbonato e colagénio – **BioGide**[®] (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça)). [3, 4, 7-10]

1.2.4 Propriedades das membranas

Uma membrana para uso estomatológico deve ser constituída por materiais biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis. A membrana deve degradar a um ritmo compatível com a correcta regeneração dos tecidos. Isto é, o processo de degradação não deve dar origem à formação de cavidades muito grandes através da membrana, pelo menos, por um

período de tempo suficiente para se ter uma reconstrução completa do lado do osso. As taxas de degradação da membrana devem coincidir com o tempo de formação dos novos tecidos. De uma forma geral, estas membranas devem funcionar por, pelo menos, 4-6 semanas para atingir uma regeneração do sistema periodontal bem-sucedida. [2, 11]

A membrana periodontal deve ainda possuir boas propriedades mecânicas, de modo a permitir a sua correcta colocação e estabilidade *in vivo*: deve ser relativamente flexível, de modo a facilitar a colocação e adaptação à cavidade, mas ao mesmo tempo não pode ser susceptível a colapso, de tal modo que permita que o espaço entre a membrana e o osso seja preservado (Figura 1.4).

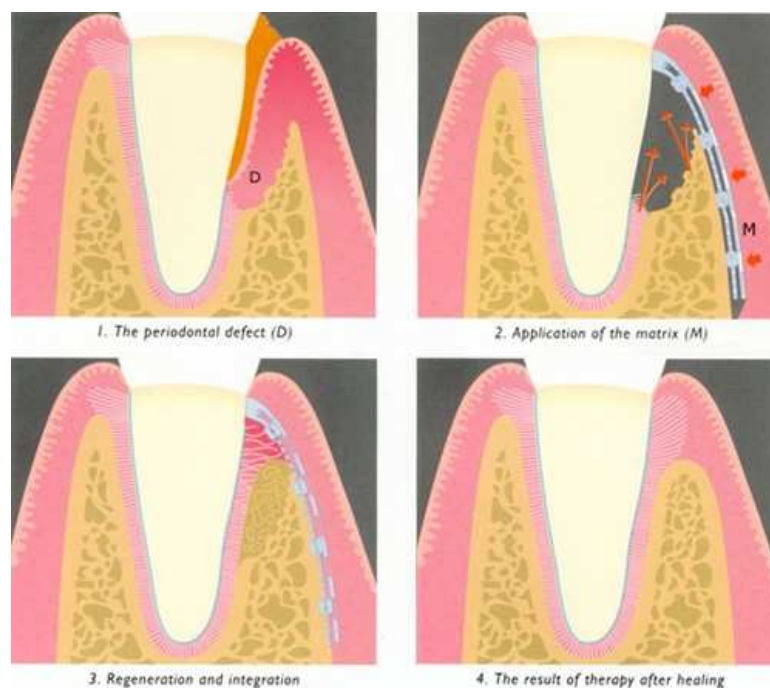


Figura 1.4 Funcionamento de uma membrana para GTR. 1 – Defeito periodontal (D); 2 – Colocação da membrana (M); 3 – Regeneração dos tecidos periodontais; 4 – Resultado final. [10]

O papel específico destas membranas é, como referido anteriormente, o de evitar a invasão de células não-osteoblásticas na cavidade em que o novo osso tem que crescer. Como tal, a membrana deve ser semipermeável, com uma porosidade adequada, para que não permita a passagem indesejada de células, de um lado para o outro da membrana, mas permita a troca de moléculas necessárias. Isto é, estas membranas devem representar uma barreira biológica, mas não uma barreira bioquímica. [11]

Na última década, investigadores têm tentado desenvolver membranas periodontais com as propriedades e características mais adequadas. No entanto, apesar dos inúmeros materiais de membrana que têm sido investigados, poucos estudos se têm centrado na técnica de preparação

da mesma. Até agora, a maioria das membranas para GTR/GBR tem sido obtida através de fundição de filme (*film casting*), filtração dinâmica ou na forma de espuma porosa, criada por métodos tradicionais, tais como a lixiviação de partículas, *solvent casting* ou *gas foaming*, utilizando polímeros sintéticos e/ou naturais. Algumas destas membranas incluem também fármacos, factores de crescimento e/ou partículas de fosfato de cálcio. [2, 4]

O método de electrofiação apresenta-se como uma nova alternativa para produção destas membranas, permitindo a preparação de membranas com uma estrutura nanofibrosa, semelhante à da matriz extracelular de certos tecidos. Já foi demonstrado que as membranas obtidas por este processo têm o potencial de promover a regeneração óssea. A elevada porosidade da estrutura permite as necessárias trocas bioquímicas. Mais importante, o tamanho dos poros destas membranas é, em geral, menor que o tamanho médio das células, e estudos anteriores demonstraram que tais poros não permitem a penetração de células, o que providenciará uma óptica barreira biológica. [4]

1.2.5 Degradação das membranas em ambiente oral

A saliva humana é um líquido aquoso segregado pelas glândulas salivares da boca (parótidas, submandibulares e sublinguais) e é constituída por, aproximadamente, 99% de água, contendo uma variedade de electrólitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.), mucina (uma glicoproteína que lubrifica os alimentos e facilita a sua passagem no esófago) e enzimas. Outras fontes responsáveis pela composição da saliva são o fluido crevicular gengival (que se origina no sulco gengival, entre os dentes e a gengiva livre), que contém bactérias orais e restos alimentares, um número estimado de 450-750 glândulas salivares menores, situadas na língua, no palato e nas bochechas, e secreções nasofaríngeas. [12, 13]

No que diz respeito à constituição enzimática da saliva, as duas enzimas principais são a amilase salivar e a lipase lingual. Para além das lipases, existem outros tipos de esterases (enzimas que hidrolisam ligações éster) na saliva, como as fosfatases alcalinas e as fosfatases ácidas. Esta classe de enzimas é a de maior interesse no que diz respeito à degradação de membranas, pois os monócitos e macrófagos, que estão presentes na gengiva normal e inflamada, produzem esterases. Em diversos estudos, têm sido também demonstrados diversos níveis de actividade de colinesterases (grupo de esterases que hidrolisam ésteres de colina a uma taxa mais elevada do que outros ésteres) na saliva humana. Nos seres humanos, existem dois tipos principais de colinesterases: acetilcolinesterase e pseudocolinesterase. [14]

1.3 Electrofiação

A electrofiação, ou *electrospinning*, é um método simples e versátil que permite produzir fibras ultra-finas, cujos diâmetros podem variar de alguns nanómetros até centenas de micrómetros, a partir de uma enorme variedade de materiais, tais como polímeros, cerâmicos e compósitos. Este tipo de abordagem é relativamente antigo na produção de fibras, mas é actualmente um dos mais avançados métodos na produção de nanofibras de alta qualidade.

A primeira patente a descrever o processo de electrofiação surgiu em 1934, quando Formalas divulgou um aparelho para a produção de filamentos de polímero a partir das repulsões electrostáticas das cargas. Até inícios dos anos 90, esta técnica era conhecida como *electrostatic spinning* e bastante subaproveitada. Só a partir desta altura, quando vários grupos de investigação demonstraram as suas potencialidades na produção de fibras a partir de uma série de polímeros orgânicos, é que começou a ser utilizado o termo *electrospinning*, a par de um crescimento exponencial de publicações e estudos nesta área. [15]

As potenciais aplicações de nanofibras obtidas pela técnica de electrofiação são variadas, com especial ênfase na área da saúde: como matrizes para engenharia de tecidos, fios de sutura, como sistemas para a libertação controlada de fármacos, entre outras. As fibras ultra-finas produzidas a partir de polímeros biodegradáveis possuem características desejáveis para aplicações nas áreas de saúde e biomédica, como os seus diâmetros reduzidos (escala nanométrica), que, sendo mesmo inferiores às dimensões das células, permitem a sua adesão e proliferação. Para além disso, estas matrizes nanofibrosas têm uma elevada razão área de superfície/volume, que se deve aos diâmetros reduzidos das fibras e carácter aleatório da deposição, e tamanhos de poros muito pequenos. [16, 17]

A técnica de electrofiação pode ser considerada uma variante do processo *electrospray*. Ambas as técnicas envolvem o uso de alta tensão para induzir a formação de um jacto carregado. Na técnica de *electrospray*, pequenas gotículas ou partículas são formadas como resultado da quebra do jacto, associada à forte repulsão electrostática e à relativamente baixa viscosidade da solução. Na electrofiação é gerada uma fibra a partir de um jacto viscoso que estira sem partir, à medida que o solvente da solução se evapora. [15]

1.3.1 Configuração e mecanismos

A Figura 1.5 mostra uma ilustração esquemática da configuração básica para electrofiação. É constituída por três componentes principais: uma fonte de alimentação de alta tensão, uma agulha metálica e um colector metálico, geralmente ligado à terra. A agulha é colocada na extremidade de uma seringa com a solução de polímero. Com o auxílio de um controlador de fluxo (ou bomba infusora) a solução pode ser dispensada através da agulha, a um fluxo constante.

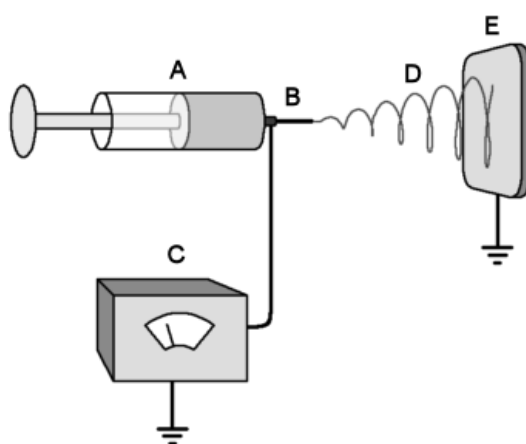


Figura 1.5 Configuração básica para electrofiação. A – Seringa; B – Agulha metálica; C – Fonte de alta tensão; D – Jacto; E – Colector ligado à terra.

Ao ser aplicada uma alta tensão positiva (geralmente da ordem das dezenas de kV), a gota de solução pendente na ponta da agulha carrega positivamente e as cargas induzidas são distribuídas uniformemente sobre a superfície. Como consequência, a gota vai sofrer dois tipos de forças electrostáticas: a repulsão electrostática entre as cargas de superfície e a força Coulombiana exercida pelo campo eléctrico externo, que se estabelece entre a agulha e o colector a um potencial mais baixo. Sob a acção dessas interações electrostáticas, a gota de solução adquire numa forma cónica, vulgarmente conhecida como o cone de Taylor (ver Figuras 1.6 e 1.7). [15, 16]

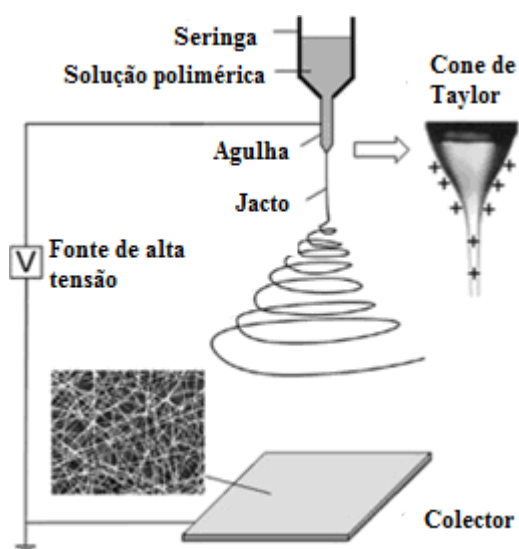


Figura 1.6 Representação esquemática do processo de electrofição. [15]

A partir do momento em que as forças electrostáticas repulsivas ultrapassam a tensão superficial da solução, forma-se um jacto a partir da ponta do cone de Taylor (Figura 1.7). À medida que este jacto carregado é acelerado para o colector, o solvente evapora gradualmente e o jacto adelgaça e arqueia, devido à instabilidade do processo. Depois de percorrer uma curta distância, a repulsão entre as cargas transportadas pelo jacto de polímero faz com que ele entre num movimento caótico, enrolando-se e agitando-se, o que causa um maior estiramento e uma consequente diminuição do diâmetro da fibra (Figura 1.8). A olho nu, o jacto pode deixar de ser visível devido à reduzida dimensão da fibra. [15, 18]

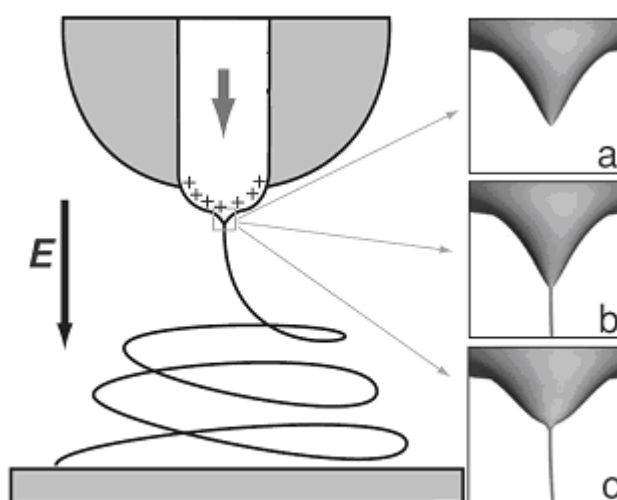


Figura 1.7 Representação esquemática da formação dos cones de Taylor. (a) Formação do cone de Taylor; (b) Formação do jacto; (c) Tensão superficial provoca a relaxação da forma cônica. [17]

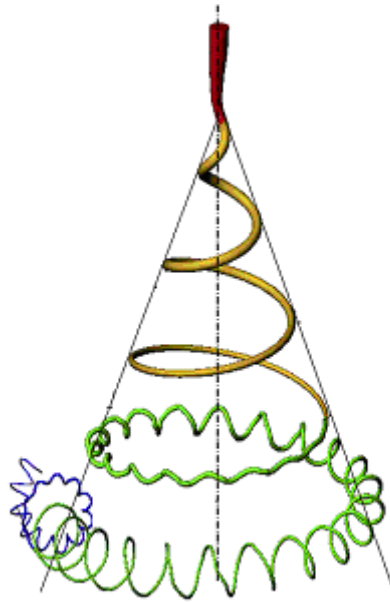


Figura 1.8 Evolução do enrolamento e estiramento do jacto. [19]

Geralmente, um jacto aparenta ter inicialmente uma forma linear que dá, depois, origem a uma série de bifurcações, isto é, do jacto inicial parecem surgir diversas ramificações. No entanto, evidências experimentais obtidas com máquinas fotográficas de alta velocidade (Figura 1.9) e modelos teóricos sugerem que é apenas uma ilusão de óptica. O jacto permanece um só, com movimentos extremamente rápidos de arqueamento. Uma explicação razoável para esta ilusão de óptica poderá ser dada facilmente pela repulsão electrostática, cada vez maior, das diferentes partes da superfície da fibra. [17]

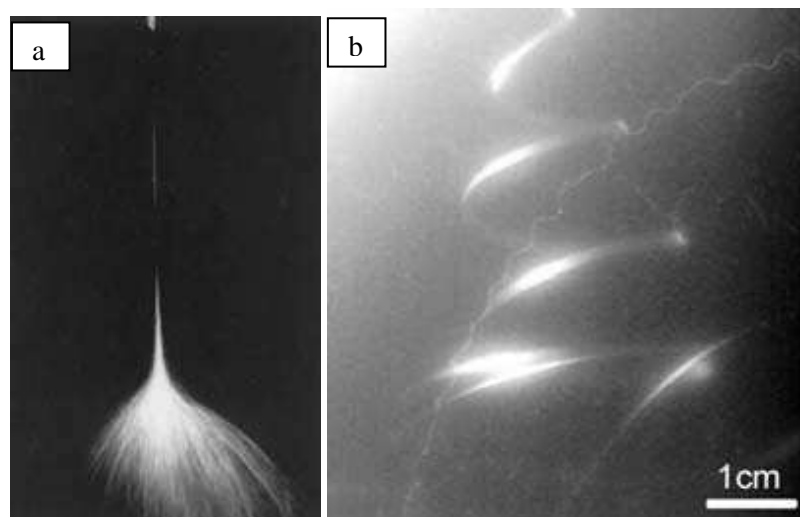


Figura 1.9 Região de instabilidade de um jacto de uma solução aquosa de PEO. (a) Bifurcação aparente do jacto; (b) Movimento em espiral de um único jacto (fotografia de alta velocidade; velocidade de obturador de 1 ms). [17]

A nível microscópico, o emaranhado das cadeias poliméricas no interior do jacto evita que ele se fragmente, resultando numa fibra nano-estruturada, que é posteriormente recolhida numa superfície rotatória ou estacionária: o colector ligado à terra. Sob condições favoráveis, à chegada ao colector, as fibras terão alcançado diâmetros na escala nanométrica e são depositadas, formando uma matriz de nanofibras. [15, 18]

As características das nanofibras, obtidas por electrofiação, dependem do polímero e solvente utilizados, bem como das condições experimentais. As propriedades da solução que afectam o processo de fiação são a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. Estas são determinadas pela natureza do polímero e solvente (ou solventes) usados e as respectivas concentrações. Os parâmetros do processo que influenciam a fiação são a alta tensão aplicada à agulha, o diâmetro da agulha, a velocidade de ejeção da solução (controlada pela bomba infusora), a distância entre a ponta da agulha metálica e o colector, o movimento do colector, a tensão aplicada ao colector e os parâmetros ambientais, como a temperatura, humidade relativa e pressão. [16, 18]

Mais de 100 polímeros diferentes, tanto sintéticos como naturais, foram transformados, com sucesso, em nanofibras através do processo de electrofiação, na maior parte dos casos a partir de soluções de polímero, sendo que também é possível electrofiar a partir de polímero fundido. Embora qualquer polímero seja um potencial candidato à electrofiação, o sucesso do processo depende de ser possível encontrar um conjunto de parâmetros adequado, o que nem sempre é fácil. A viscosidade da solução deve garantir que o jacto não quebre devido à repulsão entre cargas. A carga depende da condutividade da solução e do potencial aplicado à agulha. O potencial, para além de vencer a tensão superficial (que tende a formar gotas ou contas nas fibras), determina, juntamente com a distância entre a agulha e o colector, a aceleração do jacto em direcção a este e, consequentemente, o tempo de voo. O tempo de voo deve permitir que o solvente evapore, o que depende da taxa de evaporação do solvente para os parâmetros ambientais que se verifiquem. [17]

Polímeros padrão que já foram electrofiados com sucesso incluem polímeros sintéticos, tais como o poli(óxido de etileno) (PEO), poli(tereftalato de etileno) (PET), poliestireno (PS), poli(cloreto de vinilo) (PVC), poli(álcool vinílico) (PVA), policaprolactona (PCL), poli(vinilpirrolidona) (PVP), entre muitos outros. Também é possível electrofiar copolímeros. O processo de electrofiação tem sido também usado para produzir nanofibras a partir de polímeros de origem natural, incluindo celulose, colagénio, gelatina, quitina modificada e quitosano. [17]

1.4 Biomateriais: Polímeros

Os biomateriais são qualquer substância, ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por tempo indeterminado, aumentando ou substituindo, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida. Em termos de interacção com os tecidos circundantes, os biomateriais podem ser classificados como: bioactivos (capacidade de um material se ligar a um tecido vivo), inertes (promovem uma resposta mínima do organismo) ou biodegradáveis (o biomaterial desintegra-se com o tempo e dá lugar ao tecido recuperado). Os biomateriais utilizados hoje em dia na cirurgia periodontal são, praticamente, todos biodegradáveis, pois todos os materiais não-degradáveis se tornam muitas vezes obstáculos físicos para a regeneração dos tecidos. Desta classe de materiais, os polímeros naturais e sintéticos são a classe que oferece mais versatilidade nas suas propriedades.

Os polímeros são formados por longas cadeias com unidades repetitivas – os monómeros. Ao longo das últimas décadas, os polímeros biodegradáveis sintéticos usados clinicamente são homopolímeros (um só tipo de monómero) de ácido láctico e seus copolímeros (presença de diferentes monómeros) formados com ácido glicólico, isto é, poliésteres biodegradáveis, tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e poli(ácido glicólico-láctico). A família de poliésteres biodegradáveis tem sido considerada como um dos poucos grupos de polímeros biodegradáveis sintéticos com uma biodegradabilidade controlável, excelente biocompatibilidade e elevada segurança. As suas propriedades biodegradáveis podem ser facilmente controladas, alterando o peso molecular e a composição dos copolímeros. Dos polímeros naturais, as proteínas (colagénio, gelatina e fibrina) e os polissacarídeos (quitina, ácido hialurónico e celulose) também têm sido usados clinicamente. [1]

1.4.1 Policaprolactona

Neste trabalho é utilizado um polímero sintético de cadeia linear, a policaprolactona (PCL), que é um poliéster biodegradável e biocompatível, amplamente utilizado em aplicações biomédicas, em particular na área de engenharia de tecidos. É um poliéster alifático de grande interesse para a área de biomateriais devido às suas boas propriedades mecânicas. É facilmente fiável na presença de um campo eléctrico, dando origem a matrizes muito porosas. Estes materiais caracterizam-se por suportarem grandes deformações sem romper, isto é, possuem elevados valores de extensão à ruptura.

O PCL é um material aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) que tem sido usado na reconstrução de diversos tecidos como o osso, a pele, tecido nervoso, retina, entre outros. Para além destas aplicações este polímero também tem sido usado noutras aplicações biomédicas como fios de sutura e na libertação controlada de fármacos (Capronor[®], SynBiosys[®] e fios de sutura Monocryl[®]) [20, 21].

Para além das vantagens de ser biodegradável e biocompatível, este polímero apresenta também um custo acessível, o que o torna uma boa opção na área de engenharia de tecidos. Industrialmente, o seu custo de produção não é muito elevado, uma vez que pode ser obtido por polimerização de cadeias resultantes da abertura do anel da ϵ -caprolactona (CL), um monómero relativamente barato que pode ser obtido pela tradicional reacção de oxidação Bayer-Villing a partir de ciclohexanona. Um grande número de catalisadores e sistemas catalíticos, abrangendo praticamente toda a tabela periódica, tem sido investigado, sejam orgânicos, metais ou à base de enzimas, para obter o polímero com as características desejadas (Figura 1.10). [22, 23]

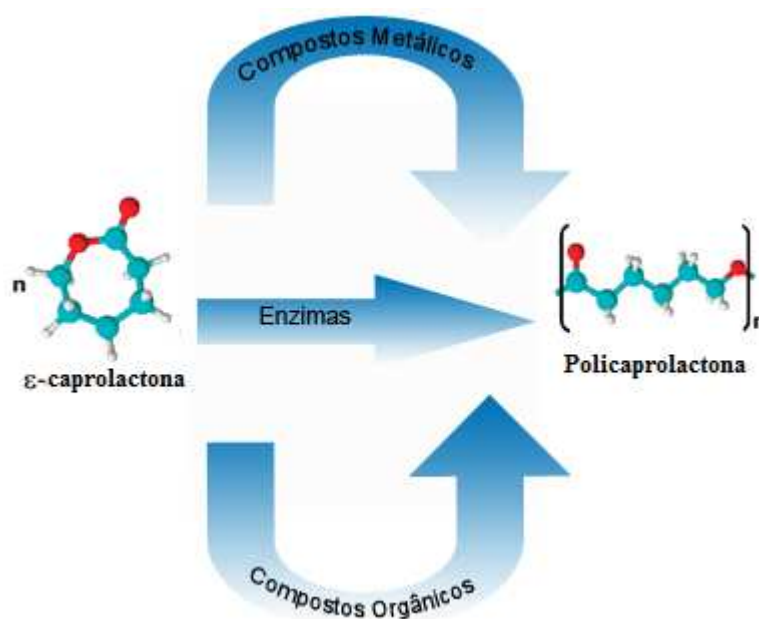


Figura 1.10 Obtenção da policaprolactona. [22]

O PCL apresenta, no entanto, uma superfície hidrofóbica, o que dificulta a desejável adesão celular. Superfícies com uma hidrofiliicidade moderada, ao contrário de superfícies hidrofóbicas, são capazes de absorver uma quantidade adequada de proteínas, preservando a sua conformação natural, o que facilita a adesão celular. Para contornar este problema, e melhorar a hidrofiliicidade e propriedades biológicas das matrizes de PCL, diversos estudos têm sido feitos

no sentido de incorporar materiais biologicamente activos nas mesmas [20]. Por essa mesma razão, as membranas de PCL produzidas neste trabalho incluem quitosano.

Para diminuir a hidrofobicidade do PCL podem também ser feitos tratamentos com plasma, que melhoram a hidrofiliabilidade ao gerar espécies de oxigénio na superfície das membranas, ou com hidróxido de sódio (NaOH), de forma a diminuir, por hidrólise, a massa molecular média do polímero, aumentando assim o número de grupos OH terminais e a hidrofiliabilidade das membranas [18].

Propriedades físico-químicas

O PCL é um polímero semi-cristalino com um grau de cristalinidade que pode chegar a 69%. Possui uma baixa temperatura de fusão (55 a 60 °C) e a temperatura de transição vítrea é na ordem dos -60 °C. As propriedades físicas, térmicas e mecânicas do PCL dependem do seu grau de cristalinidade, que por sua vez é determinado pelo seu peso molecular (normalmente entre 3000 e 100000 g/mol). A cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular. Ao processar o material, por exemplo por electrofiação, o grau de cristalinidade pode também ser alterado. [22, 23] O PCL utilizado neste trabalho possui um peso molecular entre 70000 e 90000 g/mol.

À temperatura ambiente, o PCL tem uma solubilidade elevada em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona, entre outros; é pouco solúvel em acetona, butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcoois, éter de petróleo, éter etílico e água. O PCL exhibe ainda a rara propriedade de ser miscível com muitos outros polímeros, tanto sintéticos como naturais, podendo resultar numa melhoria das propriedades mecânicas e características das membranas produzidas. [18, 22]

Biodegradação

Em condições fisiológicas, este polímero sintético é degradado por hidrólise das suas ligações éster (Figura 1.11). Esta degradação pode ocorrer por erosão superficial (degradação exterior com baixa penetração, ou ausência de penetração, de água no interior do material) ou por erosão volumica (a água penetra em toda a estrutura e a degradação ocorre homogeneamente em todo o material). Para além da degradação por hidrólise, a degradação em meio biológico pode também ocorrer por acção enzimática. Por ser um polímero alifático semi-cristalino apresenta uma taxa de degradação mais lenta do que outros polímeros (PLA, por exemplo) e é, por isso, uma melhor opção no caso de implantes de longa duração [21].

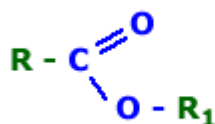


Figura 1.11 Ligação éster.

O tempo de degradação do PCL pode ir de alguns meses até vários anos dependendo do peso molecular, do grau de cristalinidade do polímero e das condições de degradação. A fase amorfa é degradada em primeiro lugar, resultando num aumento do grau de cristalinidade do polímero restante. A degradação do PCL é catalisada pelos ácidos carboxílicos libertados durante a hidrólise, mas também pode ser catalisada por enzimas, resultando numa rápida decomposição. Os seus produtos de degradação são metabolizados através do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), dando origem a CO_2 e H_2O (Figura 1.12). [22]

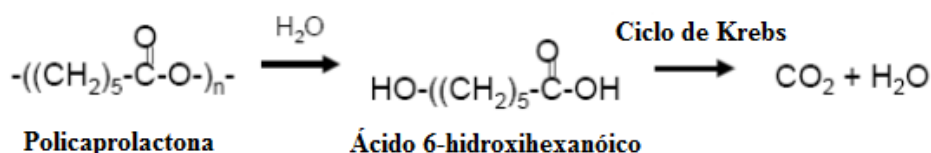


Figura 1.12 Hidrólise e metabolismo dos produtos de degradação do PCL.

A cinética da degradação de matrizes de nanofibras de PCL difere da do polímero de origem, devido à maior razão área superficial/volume, bem como a mudanças na hidrofobicidade e cristalinidade induzidas pelo processo de electrofiação. É expectável que estas membranas de nanofibras de PCL tenham uma degradação relativamente rápida comparativamente a outras estruturas obtidas a partir do mesmo material.

1.4.2 Quitosano

O quitosano, CS, tem recebido especial atenção, devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além do facto de ser obtido a partir de um recurso natural renovável e abundante: a quitina. A quitina, biopolímero β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, é o segundo mais abundante polímero natural, depois da celulose, e pode ser encontrada no exo-esqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. [24-26]

Na prática, é difícil obter quitina pura e, em geral, estão presentes algumas unidades onde o grupo acetil (COCH_3) do monómero acetilglucosamina surge substituído por H (Figura 1.13).

As unidades onde ocorre tal substituição denominam-se desacetiladas (a acetilglucosamina dá lugar a uma glucosamina). O quitosano é um dos derivados mais importantes da quitina, diferindo desta pela presença de um maior número de unidades repetitivas glucosamina. É obtido da quitina por desacetilação. As condições dessa reacção conferem ao quitosano as suas características principais, como o peso molecular médio do biopolímero e o grau de desacetilação. Considera-se quitosano o polissacarídeo com um mínimo de 50% de desacetilação, sendo o mais comum o que possui um grau de desacetilação de 70-90%. [26]

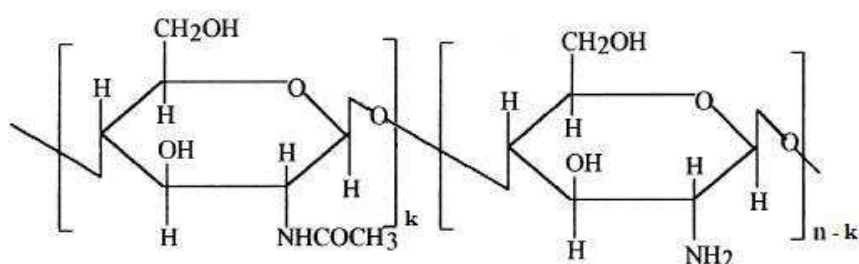


Figura 1.13 Copolímero com k unidades acetilglucosamina e $(n-k)$ unidades glucosamina. O grau de desacetilação (%) é dado por $[(n-k)/n] \cdot 100$. [24, adaptado]

Este polímero natural apresenta uma ampla gama de propriedades biológicas, o que o torna um dos materiais mais promissores para aplicações em engenharia de tecidos. Entre as aplicações mais comuns do quitosano destacam-se os materiais para regeneração de tecidos (em particular da pele), produtos dietéticos, libertação controlada de fármacos, entre outras. Das suas características mais importantes é de salientar a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, actividade anti-bacteriana, propriedades regenerativas e cicatrizantes e é de fácil acesso (baixo custo). [24, 25]

Propriedades físico-químicas

O quitosano é um polímero semi-cristalino, sendo que o seu grau de cristalinidade depende do grau de desacetilação do mesmo. A solubilidade do quitosano, por sua vez, depende do grupo amino livre (NH_2), sendo solúvel em pH ácido. O quitosano é, regra geral, insolúvel em soluções cujo pH é maior que 7. Contudo, quando o pH é menor que 6, como no caso de ácidos diluídos, os grupos amino livres são protonados, e o quitosano torna-se solúvel. [24, 27]

Biodegradação

O quitosano, como referido anteriormente, é um polímero biodegradável, que sofre degradação enzimática. A taxa de degradação do quitosano é inversamente proporcional ao seu grau de desacetilação.

A principal enzima responsável pela degradação do quitosano, a lisozima, está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos, inclusive no fluido lacrimal com teores acima de 1%. Algumas propriedades biológicas, tais como actividades anti-microbianas e cicatrizantes, têm sido atribuídas aos fragmentos (oligossacarídeos) resultantes da degradação enzimática do quitosano. Os produtos da degradação enzimática do quitosano são oligómeros de N-acetil-D-glucosamina, que, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e anti-microbianas, são totalmente absorvíveis pelo organismo. [25]

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os polímeros utilizados neste trabalho foram a policaprolactona (Aldrich, Sigma-Aldrich), com um peso molecular $M_n = 70000-90000$ g/mol, e o quitosano (Aldrich, Sigma Aldrich, “*Low molecular weight*”). O solvente utilizado foi clorofórmio ($\geq 99\%$) adquirido à Carlo Erba Reagents. A policaprolactona foi utilizada tal como recebida, na forma de grânulos, enquanto o quitosano foi peneirado com uma peneira granulométrica de 100 μm , utilizando-se apenas o quitosano com uma granulometria inferior a esta medida.

2.2 Preparação das membranas

2.2.1 Preparação das soluções

Neste trabalho foram produzidos dois tipos de soluções: soluções de PCL em clorofórmio e dispersões de quitosano em soluções de PCL em clorofórmio.

Para as soluções de PCL, colocaram-se os grânulos de PCL em clorofórmio, numa concentração de 12% (m/m). As misturas foram deixadas no agitador durante algumas horas até se observar dissolução total do polímero e as soluções ficarem homogêneas.

Na preparação das dispersões de CS nas soluções de PCL, após a dissolução do PCL no clorofórmio, adicionou-se o quitosano. Consideraram-se dispersões com diferentes concentrações de CS – 2% (m/m) e 4% (m/m) –, que foram deixadas no agitador de um dia para o outro, para garantir a boa dispersão das partículas deste polímero.

2.2.2 Montagem dos sistemas de electrofiação

Na produção das membranas foram utilizadas duas configurações diferentes. Na produção das membranas de PCL utilizou-se uma montagem experimental semelhante à da Figura 1.5, com apenas uma seringa. No caso das membranas de PCL e quitosano começou por se usar a mesma montagem, que depois foi alterada para incluir uma segunda seringa. Desta forma, produzem-se dois jactos e dois tipos de fibras em simultâneo, a partir de duas soluções. Os

elementos utilizados nas montagens experimentais encontram-se listados na Tabela 2.1. As montagens experimentais podem observar-se nas figuras 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1 Descrição dos equipamentos utilizados nas montagens de electrofiação.

| Equipamento | Fabricante – Especificações |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Seringas graduadas 5 ml | Braun – diâmetro interno de 12,74 mm |
| Seringas graduadas 10 ml | Terumo – diâmetro interno de 15,84 mm |
| Agulhas | Calibre 20 |
| Bomba infusora | Chemyx – Modelo Fusion 100 |
| Fonte de alta tensão | Construída no laboratório |
| Colector | Montado no laboratório |

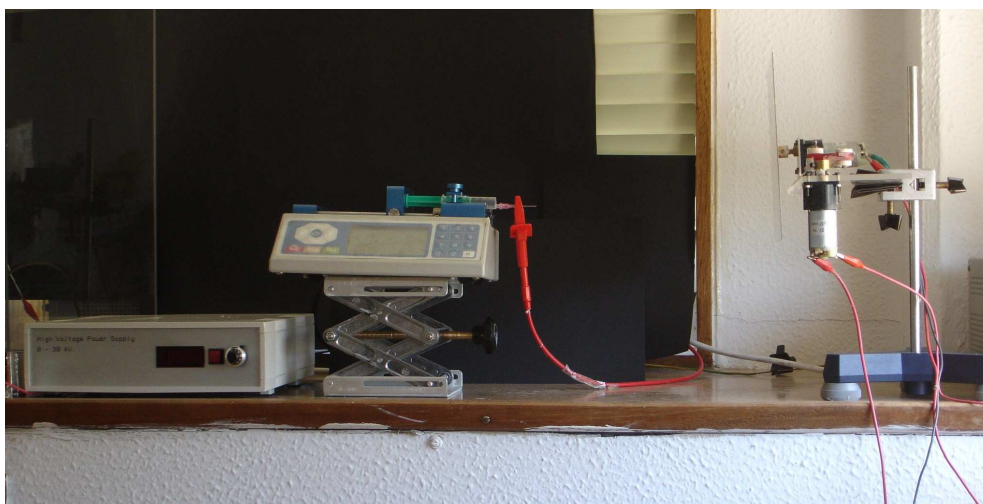


Figura 2.1 Sistema de electrofiação utilizado na produção das membranas.

2.2.3 Electrofiação

Produção da membrana de PCL:

1. Colocou-se a solução de PCL numa seringa de 5 ml, com uma agulha de calibre 20 (diâmetro interno de 0,610 mm), tendo o cuidado de retirar quaisquer bolhas de ar do interior da seringa.
2. Colocou-se a seringa na bomba infusora, introduzindo nesta os valores do diâmetro da seringa utilizada e do fluxo pretendido. Depois de diversas experiências com esta solução, foi estabelecido um fluxo de 1,0 ml/h.

3. A saída da fonte de alta tensão foi ligada à agulha através de um cabo com ponta de crocodilo. Depois de iniciada a infusão, e de verificar que a solução está a sair da ponta da agulha, aplicou-se a tensão de 13 kV (valor também estabelecido com base nos resultados de várias experiências).
4. As fibras foram depositadas num prato colector metálico vertical, revestido com papel de alumínio, colocado a uma distância fixa de 25 cm da agulha. O colector, ligado à terra, executa movimentos de rotação e de translação na horizontal, que lhe são conferidos por um sistema com dois motores, e que permite obter membranas mais uniformes.

Produção das membranas de PCL e quitosano

Para a produção das membranas com quitosano procedeu-se como anteriormente descrito, utilizando uma solução de PCL com quitosano disperso. A qualidade das matrizes conduziu à alteração das condições de produção. Passaram a utilizar-se duas seringas, de forma a ter dois jactos em simultâneo:

1. Colocou-se a solução de PCL numa seringa de 5 ml e a solução de PCL com quitosano disperso numa seringa de 10 ml, tendo sempre o cuidado de retirar possíveis bolhas de ar. Em ambas as seringas foram colocadas agulhas de calibre 20, anexadas a tubos de Teflon[®], de forma a ambos os jactos (PCL e PCL/quitosano) partirem do mesmo ponto (Figura 2.2).
2. Colocaram-se ambas as seringas na bomba infusora, introduzindo valor do diâmetro da seringa de 5 ml (12,74 mm) e o fluxo de 1 ml/h (o mesmo que foi utilizado para produzir as membranas de PCL). O fluxo da solução de PCL com quitosano disperso, colocada na seringa de 10 ml, é, nestas condições, superior a 1 ml/h, como se explica mais à frente.
3. A saída da fonte de alta tensão foi ligada a pontas metálicas inseridas nos tubos de Teflon[®] através de um cabo com ponta de crocodilo, como se pode ver na Figura 2.2. Depois de iniciada a infusão, e ao verificar que as soluções estão a sair de ambos os tubos, aplicou-se a tensão de 13 kV.
4. As fibras foram depositadas no colector metálico, a 25 cm das pontas dos tubos de Teflon[®], de forma semelhante à anteriormente descrita, dando origem às membranas 10% CS (Figura 2.3) e 20% CS.

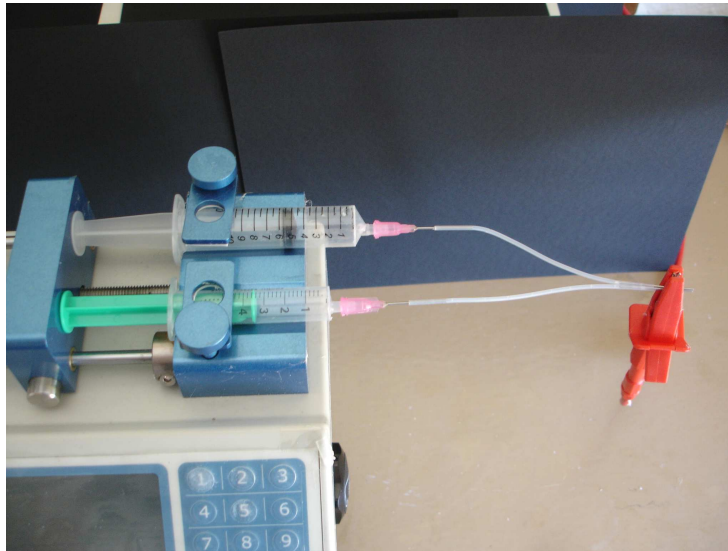


Figura 2.2 Detalhe do sistema de electrofiação utilizado na produção das membranas de PCL e quitosano.

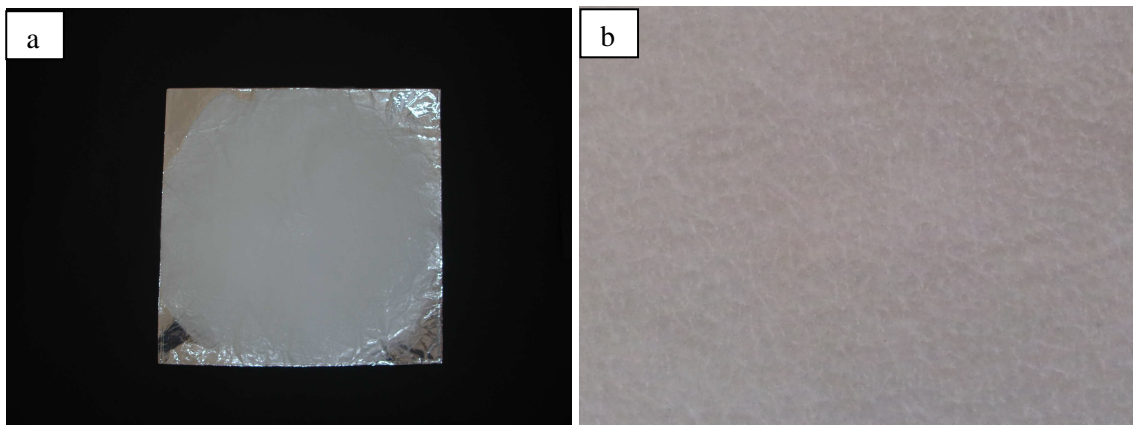


Figura 2.3 Membrana 10% CS. (a) Deposição; (b) Detalhe da superfície.

O fluxo, ou caudal, pode ser definido como o volume de fluido que atravessa uma dada área por unidade de tempo. Dada uma área A e um fluido que a atravessa com velocidade uniforme v , perpendicular a A , o caudal é:

$$\Phi = A \times v$$

A bomba infusora estabelece o fluxo através do controlo da velocidade v que imprime ao êmbolo e, consequentemente, ao fluido. Para um dado fluxo, esta velocidade é estabelecida de acordo com o diâmetro, d , da seringa:

$$\Phi = \frac{\pi}{4} \times d^2 \times v$$

Considerando d_{10} e d_5 os diâmetros internos das seringas de 10 ml e 5 ml, respectivamente, para uma mesma velocidade dos êmbolos das duas seringas, a razão dos fluxos é então dada por:

$$\frac{\Phi_{PCL+CS}}{\Phi_{PCL}} = \frac{d_{10}^2}{d_5^2} = \left(\frac{15,84}{12,74} \right)^2 \approx 1,5$$

O fluxo da solução de PCL com quitosano será então, aproximadamente, 1,5 vezes maior que o fluxo da solução de PCL, ou seja, para $\Phi_{PCL} = 1 \text{ ml/h}$, $\Phi_{PCL+CS} \approx 1,5 \text{ ml/h}$. Este último valor revelou ser adequado para produzir fibras a partir de soluções de PCL com 2% a 4% de quitosano adicionado, uma vez que, depois de efectuados diversos testes, se concluiu que estas se poderiam fiar à tensão de 13 kV para fluxos entre 1,5 ml/h e 2 ml/h. Desta forma, foi possível com uma única bomba infusora e fonte de tensão produzir, simultaneamente, fibras de dois tipos. No entanto, a relação imposta pelo procedimento à razão dos fluxos, limita a razão entre as massas de PCL e de quitosano nas membranas produzidas.

A Tabela 2.2 resume:

- As concentrações em massa de PCL ([PCL]) e de CS ([CS]) em clorofórmio nas soluções precursoras das membranas;
- Os fluxos a que as soluções foram electrofiadas (Φ_{PCL} e Φ_{PCL+CS});
- A fracção entre a massa de CS e a massa de PCL ($f_{CS/PCL}$) nas membranas produzidas.

Esta fracção é dada por:

$$f_{CS/PCL} = \frac{m_{CS}}{m_{PCL}} = \frac{\Phi_{PCL+CS} \times [CS]}{\Phi_{PCL} \times [PCL] + \Phi_{PCL+CS} \times [PCL]} \quad (2.1)$$

Tabela 2.2 Resumo sobre a produção (ver texto) das membranas produzidas neste trabalho.

| Solução 1 $\Phi_{PCL} = 1 \text{ ml/h}$ | Solução 2 $\Phi_{PCL+CS} \approx 1,5 \text{ ml/h}$ | | Membranas | |
|--|---|------|--------------|------------|
| [PCL] | [PCL] | [CS] | $f_{CS/PCL}$ | Designação |
| 12% | - | - | 0 | PCL |
| | 12% | 2% | 0,1 | 10% CS |
| | | 4% | 0,2 | 20% CS |

No final, a massa de quitosano incorporada nas membranas produzidas foi de 0%, 10% e 20% da massa de PCL nas mesmas. A partir deste ponto, as membranas produzidas passarão a ser denominadas, com base na sua constituição, como se indica na Tabela 2.2.

2.3 Tratamento com hidróxido de sódio

O tratamento com NaOH foi utilizado para aumentar a hidrofilicidade das membranas. [28] Para efectuar o tratamento, as membranas de PCL e as de PCL e quitosano foram embebidas numa solução de NaOH (Panreac, $M_n=40$ g/mol) 5 M durante 1 h. Para a membrana 10% CS foram também estudados mais dois tempos de tratamento: 30 min e 2 h. As membranas foram lavadas em água destilada 3 vezes para remover os resíduos de NaOH e colocadas no exsiccador a secar.

2.4 Caracterização

2.4.1 Morfologia das fibras

As amostras das membranas foram revestidas com uma liga de ouro-paládio, utilizando pulverização catódica de revestimento, e a sua morfologia foi observada através de microscopia electrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscope*) (Zeiss DSM 962, do CENIMAT/I3N).

2.4.2 Porosidade das membranas

A porosidade, P , é a razão percentual entre o volume de espaços vazios ou poros, V_p , e o volume total, V , de uma amostra. O volume total inclui V_p , para além do volume do conteúdo sólido da amostra, V_s . Assim:

$$P(\%) = \frac{V_p}{V} \times 100 = \frac{V - V_s}{V} \times 100 = \left(1 - \frac{V_s}{V}\right) \times 100$$

Para a determinação da porosidade foram utilizadas 5 amostras de cada membrana com a dimensão de (3x1) cm². Depois de obtidas as respectivas massas e espessuras, determinou-se a

densidade aparente das amostras. Uma forma de calcular a porosidade baseia-se na determinação da densidade aparente de uma amostra de massa, m , e volume, V :

$$\rho_{aparente} = \frac{m}{V} \quad (2.2)$$

Como a massa da amostra é devida ao seu conteúdo sólido de densidade ρ_s , então $m = \rho_s \times V_s$. A porosidade é então dada por [18]:

$$P(\%) = \left(1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_s} \right) \times 100 \quad (2.3)$$

A densidade ρ_s foi estimada tendo em conta os valores da razão $f_{CS/PCL}$ (Tabela 2.2), das densidades do PCL (ρ_{PCL}) e do CS (ρ_{CS}) sólidos:

$$\rho_s = \frac{m_{PCL} + m_{CS}}{V_{PCL} + V_{CS}} = \frac{1 + f_{CS/PCL}}{\frac{1}{\rho_{PCL}} + \frac{f_{CS/PCL}}{\rho_{CS}}} \quad (2.4)$$

Para a densidade do PCL considerou-se o valor tabelado ($\rho_{PCL} = 1,145 \text{ g / cm}^3$) [18] e a densidade ρ_{CS} foi determinada a partir da massa e do volume de um filme de CS obtido para o efeito.

A porosidade de cada membrana foi obtida a partir da média das 5 amostras consideradas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

2.5 Medição dos ângulos de contacto

O ângulo de contacto entre uma gota de água e uma matriz é função da hidrofilicidade da matriz, como se mostra na Figura 2.4. Quanto menor o ângulo de contacto, mais hidrofílica é a matriz. Da mesma forma, quanto maior o ângulo de contacto, mais hidrofóbica é a matriz.

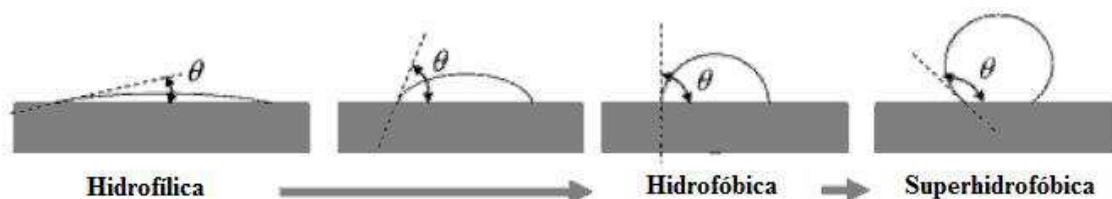


Figura 2.4 Caracterização das superfícies segundo o ângulo de contacto.

Para avaliar a hidrofilicidade das membranas e a eficácia do tratamento de 1 h com uma solução NaOH 5 M, foram medidos os ângulos de contacto das três membranas (PCL, 10% CS e 20% CS), com e sem tratamento. No caso da membrana 10% CS foram também medidos os ângulos de contacto para os tratamentos de 30 min e 2 h.



Figura 2.5 Aparelho utilizado nas medições dos ângulos de contacto (KSV CAM 101).

Os ângulos de contacto da superfície das membranas foram medidos no departamento de Química da FCT-UNL, com o auxílio do aparelho KSV CAM 101 (Figura 2.5). Este é um instrumento totalmente controlado por computador, em que a análise da forma da gota é feita com base na captura automática de imagens de vídeo. Foi colocada uma gota de água destilada em locais diferentes das amostras, de modo a que as várias gotas se comportassem como se estivessem isoladas. No total foram realizados 10 ensaios para cada condição. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

2.6 Esterilização com radiação gama

A irradiação das amostras com radiação gama foi a opção escolhida para a sua esterilização pois, para além de ser um método previsto nas normas de esterilização de dispositivos médicos, não produz resíduos tóxicos, como por exemplo o óxido de etileno. A auto-clavagem não foi colocada como hipótese, uma vez que destruiria as membranas (o PCL

tem uma baixa temperatura de fusão, à volta de 60 °C). A dose padrão de radiação gama para esterilização deste tipo de produtos, que se inserem na categoria de dispositivos médicos, é de 2,5 Mrad (25 kGy) (ISO 11137-2:2006) [29].



Figura 2.6 Unidade experimental de irradiação de ^{60}Co – Precisa 22 ML.

As amostras, previamente tratadas com NaOH, foram irradiadas no ITN (Instituto Tecnológico e Nuclear, Sacavém, Portugal) com radiação gama, utilizando uma unidade experimental de irradiação de ^{60}Co (Precisa 22 ML, Gravinier, Lda, Reino Unido). A câmara de irradiação é uma cavidade revestida por aço inoxidável, de forma aproximadamente paralelepipedica, cuja face superior é encurvada, com 65 cm de altura máxima, 50 cm de profundidade e 20 cm de largura. A câmara de irradiação tem quatro níveis, onde se podem colocar porta amostras com locais fixos de irradiação. No exterior, existe um painel de controlo que poderá funcionar em modo manual e automático (Figura 2.6). [30]

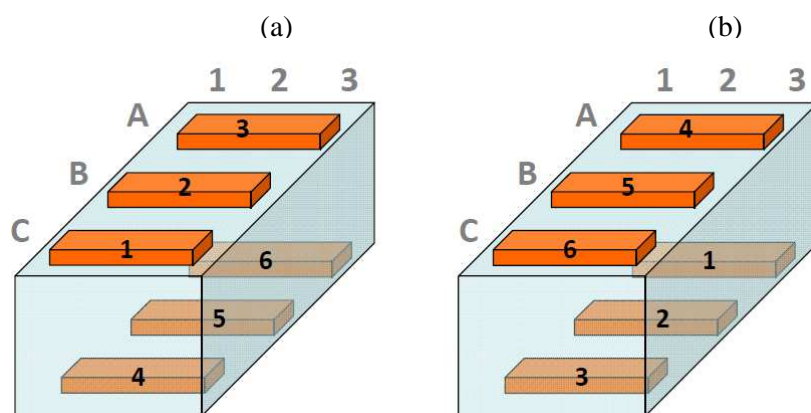


Figura 2.7 Posição dos dosímetros. (a) Período [0h-5h40]; (b) Período [5h40-11h20].

A irradiação das amostras foi realizada por dois períodos de 5h40, perfazendo um total de 11h20, entre os quais se trocaram as posições das amostras, de forma a garantir uma maior uniformização nas doses recebidas pelas mesmas. As amostras foram irradiadas em embalagens seladas. A dose recebida em cada zona do porta-amostras foi medida com o auxílio de dosímetros (Amber, Lote P), como se mostra na Figura 2.7.

A dose recebida por cada dosímetro, no total das 11h20, encontra-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Dose total recebida por cada dosímetro no período de 11h20.

| Dosímetro | Dose (kGy) |
|-----------|------------|
| 1 | 23,5 |
| 2 | 27,4 |
| 3 | 24,7 |
| 4 | 25,0 |
| 5 | 27,3 |
| 6 | 22,4 |

2.7 Ensaios de tracção

As propriedades mecânicas das membranas foram analisadas com o recurso a ensaios de tracção. Foram estudadas as três membranas (PCL, 10% CS e 20% CS), antes e depois da esterilização com radiação gama, para verificar até que ponto este processo afecta a sua estabilidade, isto é, se produz alterações nas propriedades mecânicas. As membranas foram cuidadosamente cortadas em amostras rectangulares, com 1 cm de largura e 3 cm de comprimento. A espessura das amostras foi determinada com uma craveira digital (Mitutoyo, 500-196-20 Digimatic Digital Caliper, 0-150 mm), com uma precisão de 0,01 mm, em três zonas distintas.

Os ensaios de tracção foram realizados numa máquina de ensaios de tracção uniaxial, Rheometric Scientific, com célula de carga de 20 N e operável através do *software* “Minimat”, a uma velocidade de 5 mm/min, em condições ambiente. Apenas 1 cm do comprimento da amostra foi traccionado, destinando-se os 2 cm restantes à fixação da mesma. Para cada tipo de membrana foram testadas 10 amostras.

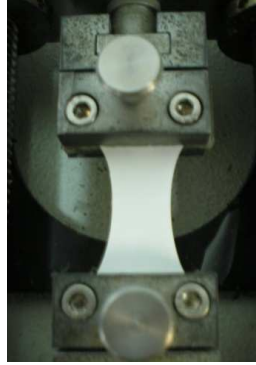


Figura 2.8 Comportamento mecânico de uma amostra de PEO ao ser traccionada.

Quando é aplicada uma força, ou carga, numa secção de material perpendicular à mesma, define-se tensão, σ , como $\sigma = F / A$ (N/m^2 ou Pa). A deformação, ε , é definida como a razão entre o alongamento do material, Δl , e o comprimento original, l_0 , sendo uma medida adimensional. A curva de tracção do material é o gráfico $\sigma(\varepsilon)$. Numa curva de tracção típica (Figura 2.9) a zona inicial caracteriza-se por uma resposta linear do material à tracção, isto é, o material exhibe numa primeira fase de traccionamento um comportamento elástico, bem descrito pela lei de Hooke ($\sigma = E \times \varepsilon$). O módulo de Young, E , ou módulo de elasticidade, é o declive desta zona e é o parâmetro mecânico que mede a rigidez elástica do material.

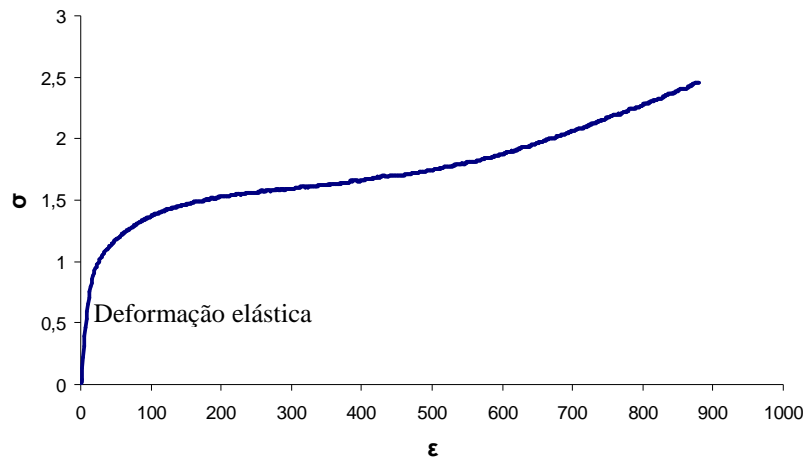


Figura 2.9 Curva de tracção.

Os dados da força de tracção (em N) e do alongamento (em mm) de cada amostra foram gravados pelo *software* e convertidos em curvas de tracção (tensão (MPa) vs. deformação) para obtenção do E (em MPa). A tensão de tracção foi calculada usando a área de secção recta de cada amostra. O módulo de Young de cada membrana foi determinado pela média dos ensaios efectuados com as 10 réplicas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

2.8 Testes de degradação

Os testes de degradação foram realizados na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa e tiveram como objectivo simular o ambiente oral a que as membranas estarão sujeitas e analisar a sua degradação no mesmo. O estudo foi efectuado com as membranas, previamente tratadas com NaOH, em três condições: meio ácido, pH fisiológico e meio enzimático.

2.8.1 Meio ácido

Para esta condição, considerou-se uma solução tampão de ácido acético-acetato de sódio, com pH = 3,74. A solução tampão foi preparada colocando 250 ml de uma solução de ácido acético (Merck) 1 M e 4,1015 g de acetato de sódio (Sigma-Aldrich) num balão volumétrico de 500 ml e perfazendo o volume com água destilada. Esta solução ficou assim com concentrações de ácido acético e de acetato de sódio de 0,5 M e 0,1 M, respectivamente.

2.8.2 pH fisiológico

O pH fisiológico foi simulado com uma solução tampão de fosfatos, com pH 7,2. A solução foi preparada dissolvendo num litro de água destilada uma pastilha de “*Buffer Tablets pH 7,2 for microscopy*” (Merck), cuja composição é 0,63 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hidrogenofosfato de sódio di-hidratado) e 0,31 g KH_2PO_4 (hidrogenofosfato de potássio).

2.8.3 Meio enzimático

No caso do estudo da degradação enzimática do PCL são de maior interesse as esterases devido às ligações éster no PCL, passíveis à hidrólise. Como é o PCL o polímero que confere estabilidade mecânica às membranas, foi usada uma esterase: a acetilcolinesterase. A escolha desta enzima prendeu-se com o facto da acetilcolinesterase estar bem documentada no que diz respeito à degradação de biomateriais e compósitos para aplicação estomatológica.

A solução enzimática de acetilcolinesterase (Sigma, Ref: C2888) foi preparada de acordo com as especificações do fornecedor, dissolvendo o liofilizado em 1 litro de solução tampão pH 7,2, de modo a obter-se a actividade enzimática de 1 U/ml de solução.

Os testes de degradação foram realizados por incubação das amostras, previamente pesadas (réplicas quadradas com cerca de 2 cm de lado), em tubos de ensaio contendo as diferentes soluções. Todas as soluções foram suplementadas com 0,04% (m/v) de azida de sódio (Himedia, Lote 3-1625) para impedir o crescimento bacteriano. Para cada condição foram utilizadas quatro réplicas. Os tubos de ensaio foram colocados numa estufa a 37 °C. Após períodos de imersão de 1 semana e de 1 mês, as amostras foram retiradas dos tubos de ensaio, cuidadosamente lavadas com água destilada e colocadas no exsiccador. Depois de secas, as amostras foram pesadas para determinar a perda de massa.

2.9 Testes de bioactividade

O protocolo de preparação do SBF (*Simulated Body Fluid*) foi adoptado de Jalota et al. [31]. Preparou-se uma solução SBF, que pretende simular o plasma do sangue humano, cujas concentrações se encontram na Tabela 2.4. As quantidades e ordem de adição dos vários reagentes usados na preparação de 1 litro da solução aquosa encontram-se discriminadas na mesma tabela.

Tabela 2.4 Protocolo para a preparação de 1 L de solução SBF e comparação entre as quantidades de vários iões na solução e no plasma humano.

| Ordem | Reagente | Quantidade (gpl) | Ião | Plasma humano (mM) | SBF (mM) |
|-------|---|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------|
| 1 | NaCl | 6.547 | Na ⁺ | 142 | 142 |
| 2 | NaHCO ₃ | 2.268 | Cl ⁻ | 103 | 125 |
| 3 | KCl | 0.373 | HCO ₃ ⁻ | 27 | 27 |
| 4 | Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0.178 | K ⁺ | 5 | 5 |
| 5 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 0.305 | Mg ²⁺ | 1.5 | 1.5 |
| 6 | HCl 1M | 15 ml | Ca ²⁺ | 2.5 | 2.5 |
| 7 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.368 | HPO ₄ ²⁻ | 1 | 1 |
| 8 | Na ₂ SO ₄ | 0.071 | SO ₄ ²⁻ | 0.5 | 0.5 |
| 9 | (CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ | 6.057 | | | |
| 10 | HCl 1M | Adicionar até pH=7.4, para T=37 °C. | | | |

Foram utilizados os seguintes reagentes na preparação do SBF em água destilada:

1. Cloreto de sódio (NaCl, Himedia)
2. Cloreto de potássio (KCl, Sigma, Sigma-Aldrich)
3. Bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma, Sigma-Aldrich)
4. Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O, Aldrich, Sigma-Aldrich)
5. Sulfato de sódio (Na₂SO₄, Panreac)
6. Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O, Aldrich, Sigma-Aldrich)
7. Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (Na₂HPO₄.2H₂O, Fluka Analytical, Sigma-Aldrich)
8. Tris ((CH₂OH)₃CNH₂) (Sigma Life Science, Sigma-Aldrich)
9. Solução HCl 1M (HCl 37%, Panreac)

Os estudos de imersão foram realizados por incubação das amostras (réplicas quadradas com cerca de 1 cm de lado) em cerca de 2 ml de solução SBF em placas de 24 poços, colocadas numa estufa a 37 °C. O nível, ou quantidade de SBF em cada poço, foi reposto de 5 em 5 dias, para que as amostras se mantivessem sempre submersas. Para cada condição, ou seja, para cada material e tempo de observação, foi utilizada uma réplica.

Após períodos de imersão de 5, 10, 20 e 30 dias, foram retiradas da estufa amostras que, após remoção do excesso de SBF, foram colocadas numa estufa a 40 °C para secar. Depois de secas, as membranas foram então revestidas com ouro-paládio, utilizando pulverização catódica de revestimento, e a sua morfologia foi analisada por SEM.

2.10 Culturas celulares

Os testes de cultura celular foram realizados na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, com o objectivo principal de se avaliar a adesão celular às membranas produzidas. Utilizou-se a linha celular MCF-7 com expressão de GFP (*Green Fluorescent Protein*), o que reduz os custos de observação, constituída por células aderentes. Esta é uma linhagem de células epiteliais neoplásicas.

As células MCF-7/GFP foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Pen-Step+antimicótico, Invitrogen) e 1% (v/v) de solução de aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen). A expansão foi efectuada em frascos de cultura celular de

75cm² (BD Biosciences) com incubação numa estufa HERA Cell 150i (Thermo Scientific) a 37°C e com 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa.

Antes da cultura celular, amostras das diferentes membranas produzidas foram fixadas a lamelas circulares de 12 mm de diâmetro. As amostras foram colocadas de forma a oferecer, numa face, um revestimento plano para a cultura. Na face oposta, foram fixadas com um pouco de solução de PCL em clorofórmio. Posteriormente, estas lamelas foram esterilizadas por irradiação gama, dentro de embalagens próprias para este fim, como descrito anteriormente (secção 2.6).

Numa câmara de fluxo laminar, as lamelas foram retiradas das embalagens e colocadas em placas de 24 poços, onde foram embebidas em meio de cultura durante 2 dias, de forma a facilitar a adesão celular. Terminado este período, aspirou-se o meio de cultura dos poços e a cada um adicionou-se o volume necessário da suspensão celular, anteriormente preparada (procedimento descrito no Anexo 1), e o restante meio celular, por forma a semear nas membranas uma densidade de 5×10^4 células/ml. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24h, as culturas celulares foram observadas no microscópio confocal de fluorescência (Zeiss LSM 710).

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação dos parâmetros de produção

Inicialmente, foi realizado um estudo preliminar do efeito de vários parâmetros que influenciam o resultado do processo de electrofiação (concentração do polímero, tensão aplicada e fluxo), de modo a determinar um conjunto de parâmetros adequados para a produção de fibras de boa qualidade a partir de uma solução de PCL em clorofórmio. Neste estudo fixou-se a distância entre a ponta da agulha e o colector em 25 cm.

3.1.1 Concentração da solução de PCL

Como se pode ver pelas imagens de MO da Figura 3.1, a morfologia das fibras mudou drasticamente com a concentração de PCL. Comparando os dois conjuntos de imagens, é perceptível que a solução 8% PCL deu origem a fibras irregulares, com contas (“beads”), enquanto a solução de 12% PCL, por outro lado, deu origem a fibras de diâmetro regular. Estes resultados podem ser explicados pela viscosidade das soluções utilizadas, que está directamente relacionada com a concentração do polímero: quanto maior a concentração do polímero, maior é a viscosidade da solução.

A viscosidade das soluções tem uma forte influência no resultado do processo de electrofiação. As forças viscoelásticas, dependentes da viscosidade, opõem-se ao estiramento do jacto polimérico e à acção da tensão superficial. A partir de determinado valor de viscosidade, o jacto pode ser estirado sem quebrar e sem a formação de contas. A baixa viscosidade, por um lado, facilita o estiramento das fibras, mas, por outro lado, se as forças associadas à tensão superficial forem suficientemente fortes, pode não impedir a formação de contas. [18]

Perante estes resultados, foi necessário optar pela solução de maior concentração, e consequentemente de maior viscosidade, para a produção das membranas, de forma a obter fibras regulares e com diâmetros uniformes.

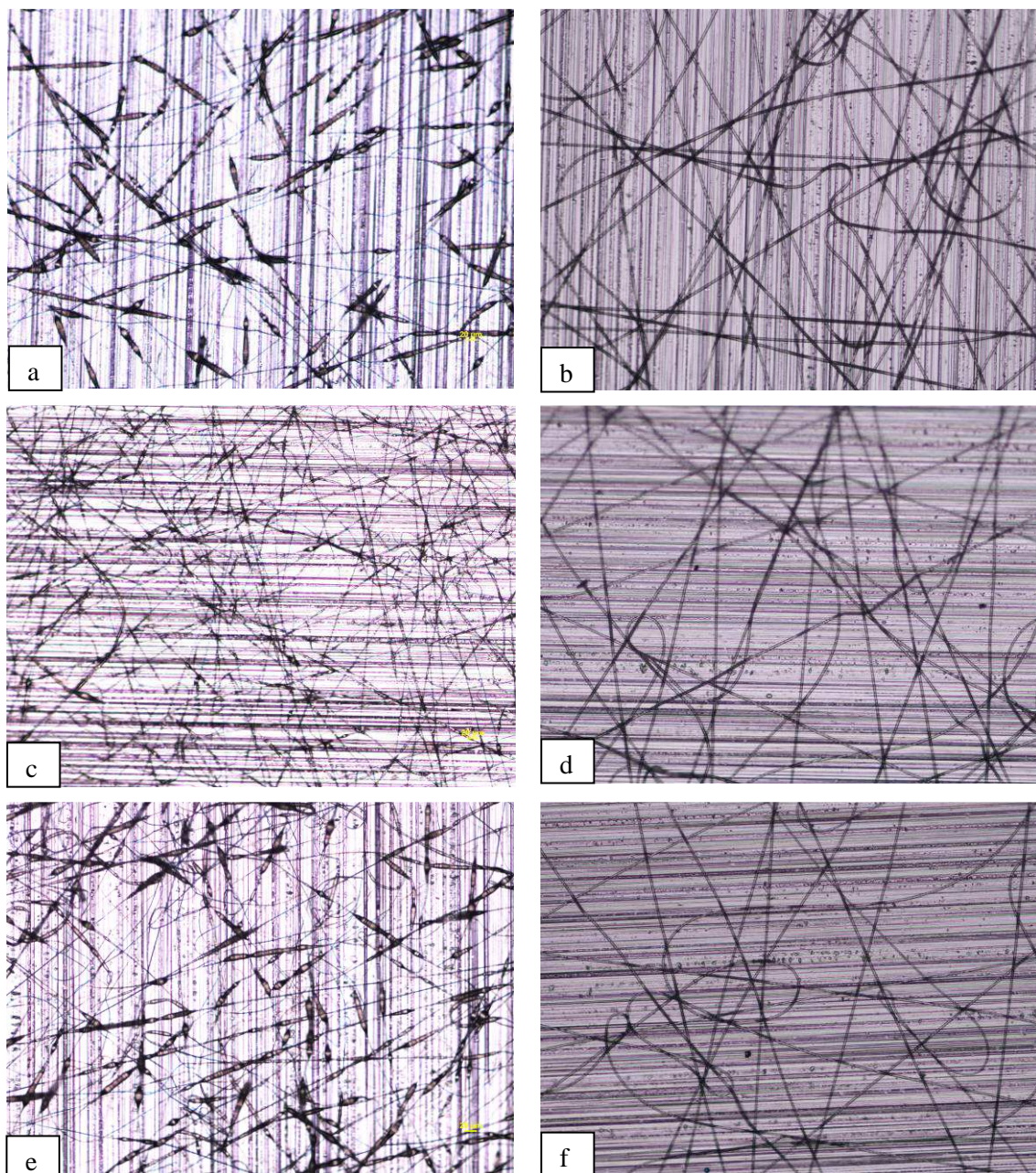


Figura 3.1 Imagens de MO das fibras produzidas a partir das soluções 8% PCL (à esquerda) e de 12% PCL (à direita), para uma distância de 25 cm e um fluxo 0,5 ml/h. (a) e (b) 11 kV; (c) e (d) 13 kV; (e) e (f) 15 kV.

3.1.2 Tensão aplicada

A tensão aplicada determina a carga fornecida ao polímero e, quanto maior a carga, maior a repulsão das cargas responsável pelo estiramento do jacto. Isto contribuiria para um menor diâmetro das fibras. No entanto, dois processos competem para determinar o diâmetro final das fibras: a repulsão entre as cargas transportadas pela solução alonga o jacto, mas, por outro lado, a evaporação do solvente provoca um aumento da viscosidade que impede um maior estiramento do jacto e uma consequente redução do diâmetro. [18]

Para além da carga induzida à solução polimérica, a tensão aplicada, em conjunto com a distância entre a agulha e o colector, determina também a intensidade do campo eléctrico entre a agulha e o colector. Quanto maior a diferença de potencial entre agulha e o colector, maior o campo eléctrico e, conseqüentemente, menor é o tempo de voo. A diminuição do tempo de voo resulta numa evaporação incompleta do solvente e, eventualmente, no aparecimento de fibras fundidas. Dependendo do balanço entre os efeitos atrás descritos, o diâmetro das fibras pode ou não ser reduzido pelo aumento da tensão aplicada. [16]

Mais uma vez, observando as imagens da Figura 3.1, para a solução de 12% PCL, é visível que a morfologia das fibras não sofreu grandes alterações com os valores de tensão testados (11 kV, 13 kV e 15 kV). Como nas três situações as fibras produzidas apresentam diâmetros regulares, escolheu-se o valor de 13 kV.

3.1.3 Fluxo

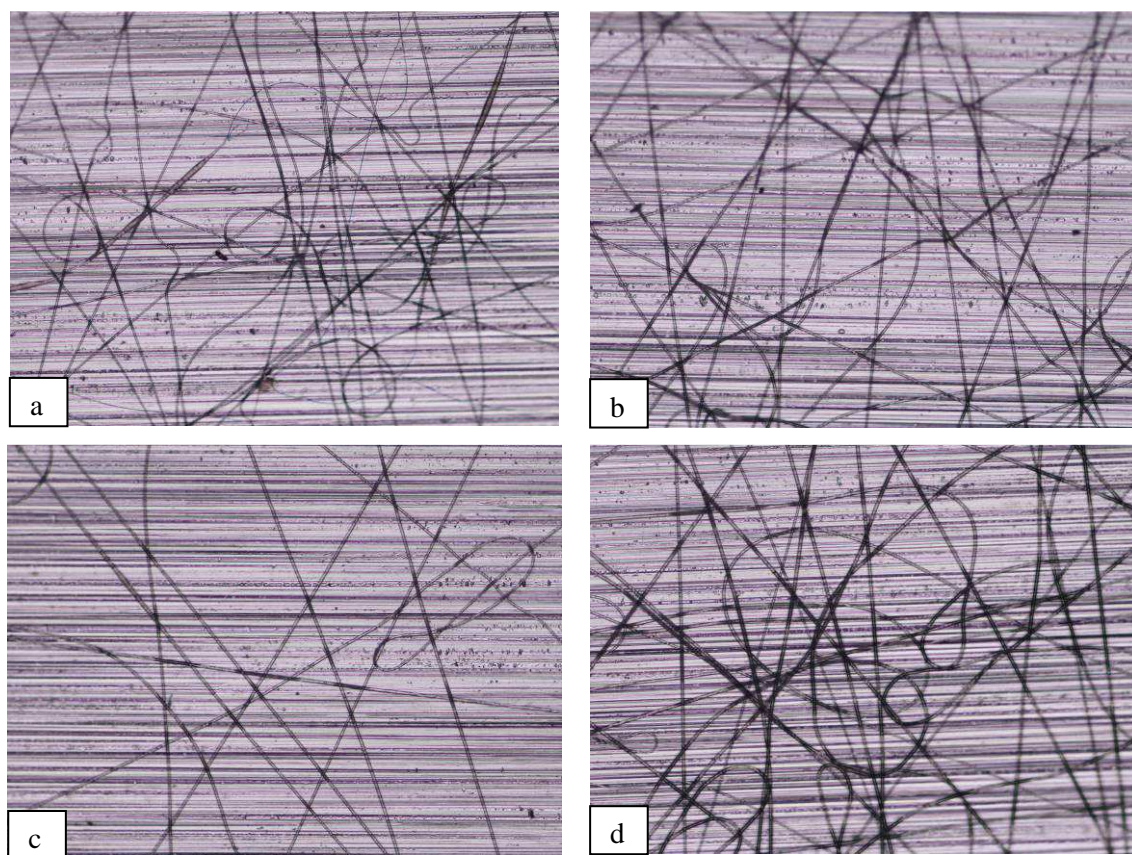


Figura 3.2 Imagens de MO das fibras produzidas a partir de uma solução 12% PCL, para diferentes fluxos. (a) 0,3 ml/h; (b) 0,5 ml/h; (c) 0,7 ml/h; (d) 1 ml/h. Tensão de 13 kV e distância agulha-colector de 25 cm.

A quantidade de solução que chega à ponta da agulha e, portanto, disponível para ser extraída pela força exercida pelo campo eléctrico na solução, varia de acordo com o aumento ou diminuição do fluxo. Um fluxo mais baixo pode levar a interrupções no jacto, devido à indisponibilidade de solução suficiente, e um fluxo mais elevado pode levar a uma acumulação de solução na ponta da agulha devido a uma insuficiente taxa de extracção.

Solução 12% PCL

O efeito da variação do fluxo, entre 0,3 ml/h e 1 ml/h, nas fibras de PCL pode ser visto na Figura 3.2. Observando as imagens, é visível que o aumento do fluxo provocou um aumento do diâmetro das fibras. Para um fluxo mais baixo (0,3 ml/h), o jacto sofreu interrupções, dando origem a fibras irregulares. Pelo contrário, para fluxos superiores (entre 0,5 e 1 ml/h) as fibras apresentam-se uniformes, sendo qualquer um destes fluxos uma boa opção para a produção de fibras a partir de uma solução 12% PCL em clorofórmio.

Solução 12%PCL + CS

Utilizando as mesmas condições (tensão e distância) estabelecidas para a produção das fibras de PCL, ou seja, uma tensão de 13 kV e uma distância entre a ponta da agulha e o colector de 25 cm, testou-se uma solução de 12% PCL + 1% CS, variando os fluxos entre 0,3 e 2 ml/h. As imagens de MO são visíveis na Figura 3.3. Pela observação das imagens, pode-se concluir que as melhores fibras são obtidas com os maiores valores de fluxo. Isto é, apenas para fluxos superiores a 1 ml/h (1,5 ml/h e 2 ml/h) se conseguem obter fibras relativamente uniformes, apesar das irregularidades conferidas pelas partículas de quitosano. Para fluxos inferiores a 1 ml/h o jacto tem tendência a partir, dando origem a fibras muito irregulares e descontínuas. Para além disso, ao utilizar valores inferiores a 1 ml/h as partículas de quitosano têm tendência a acumular-se na agulha, acabando por entupi-la e impedindo o processo de electrofiação.

Mesmo optando pelo fluxo mais elevado, é visível que as fibras apresentam grandes variações no diâmetro: em regiões que contêm partículas de quitosano as fibras são grossas, mas rapidamente dão lugar a regiões extremamente finas, sem quitosano. Esta morfologia conduz a membranas frágeis. Para contornar o problema, optou-se por fazer deposições duplas, com duas seringas, depositando em simultâneo fibras de PCL e fibras de PCL com quitosano. As fibras de PCL seriam responsáveis pelas boas propriedades mecânicas da membrana, enquanto as fibras de PCL e quitosano incorporariam as partículas de quitosano nas membranas.

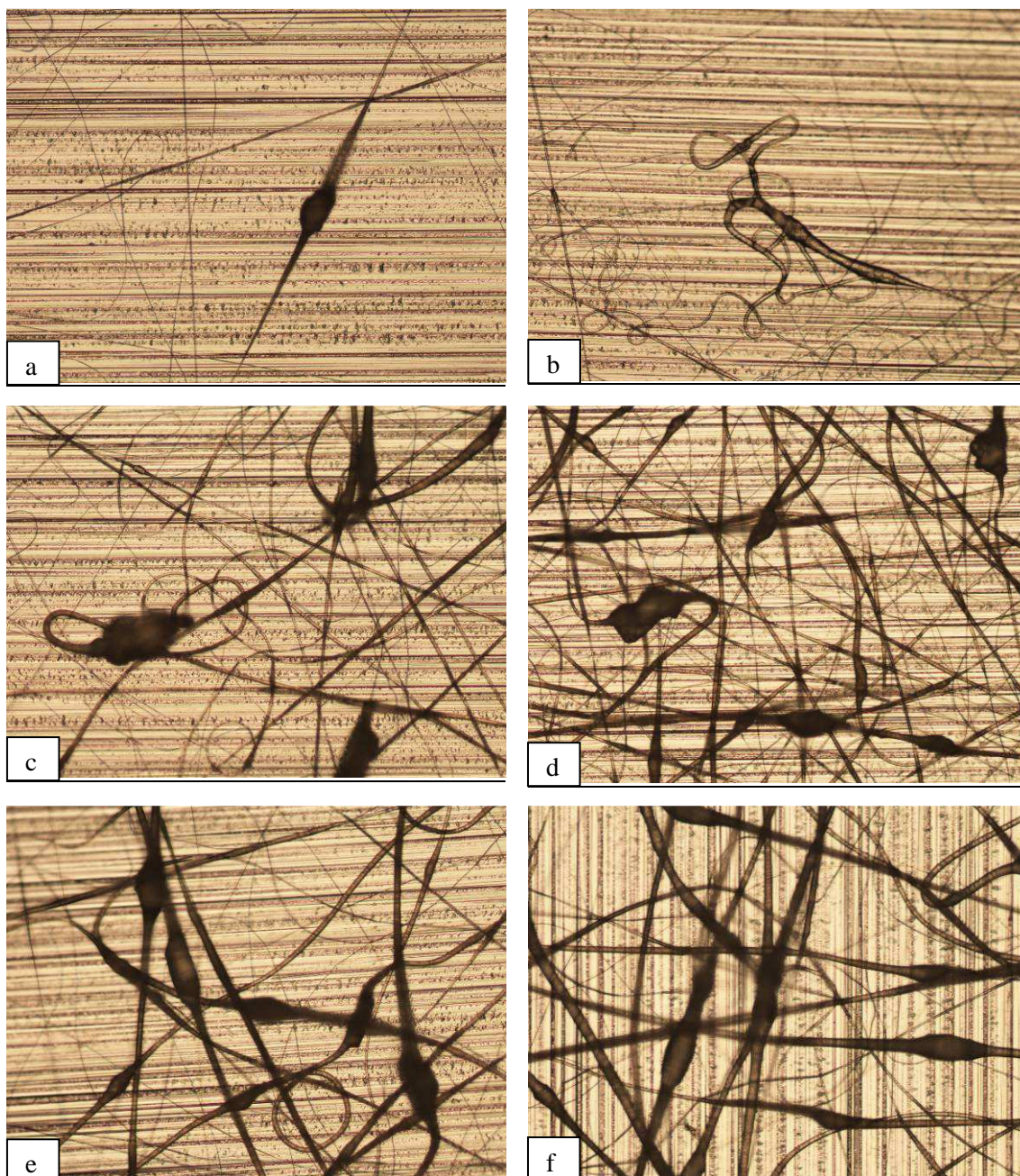


Figura 3.3 Imagens de MO das fibras produzidas a partir de uma solução 12% PCL + 1% CS, para diferentes fluxos. (a) 0,3 ml/h; (b) 0,5 ml/h; (c) 0,7 ml/h; (d) 1 ml/h; (e) 1,5 ml/h; (f) 2 ml/h. Tensão de 13kV e distância agulha-colector de 25 cm.

3.1.4 Deposição conjunta

As imagens de MO das deposições que posteriormente deram origem às membranas 10% CS e 20% CS encontram-se na Figura 3.4. Como se pode observar, o objectivo foi alcançado com sucesso, uma vez que se produziram fibras de PCL (mais finas e com diâmetros uniformes) e fibras de PCL com quitosano em simultâneo. Os parâmetros estabelecidos para a produção das membranas mantiveram-se, em termos de distância e tensão (25 cm e 13 kV). No que diz respeito ao fluxo, e tirando partido da utilização de apenas uma bomba infusora, estabeleceu-se

um fluxo de 1 ml/h para a solução de PCL e 1,5 ml/h para a solução de PCL com CS. Para tal, utilizaram-se duas seringas, com diferentes diâmetros, tal como foi explicado no capítulo Materiais e Métodos (página 23).

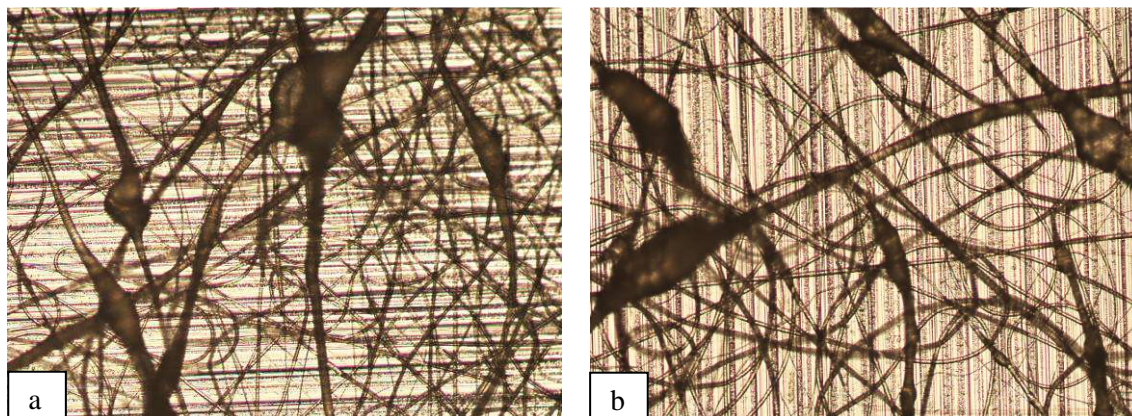


Figura 3.4 Imagens de MO das deposições duplas. (a) 12% PCL e 12% PCL + 2% CS (membrana 10% CS); (b) 12% PCL e 12% PCL + 4% CS (membrana 20% CS).

3.2 Caracterização das membranas

3.2.1 Morfologia das fibras

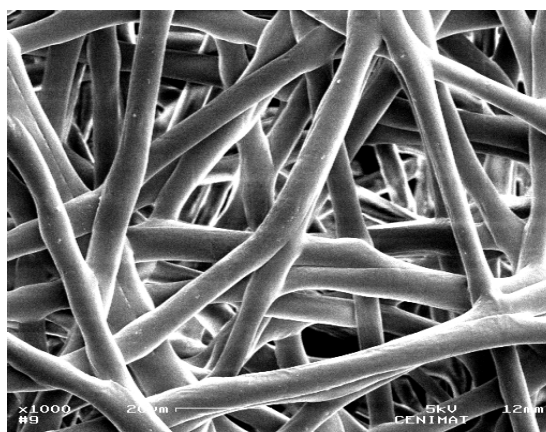


Figura 3.5 Imagem de SEM da membrana de PCL, ampliação 1000x.

A análise das imagens de SEM permitiu confirmar que as membranas obtidas por electrofiação são compostas por fibras com diâmetros regulares, sem contas nem defeitos que possam afectar as suas propriedades mecânicas. Na Figura 3.5 são visíveis as fibras que constituem a membrana de PCL, com um diâmetro médio na ordem de alguns micrómetros.

Nas imagens (a) e (b) da Figura 3.6 podem ver-se as membranas de 10% CS e 20% CS, respectivamente. É importante lembrar que estas membranas, devido ao processo de produção,

são constituídas por dois tipos de fibras: as fibras de PCL, semelhantes às da Figura 3.5, e as fibras de PCL e quitosano. As fibras com quitosano na sua constituição são bastante irregulares, sendo que a adição de quitosano provoca um aumento do diâmetro médio destas fibras, principalmente nas zonas onde estão as partículas de quitosano. Esta irregularidade na morfologia das fibras afectará as suas propriedades mecânicas, como se poderá comprovar com os resultados dos testes mecânicos.

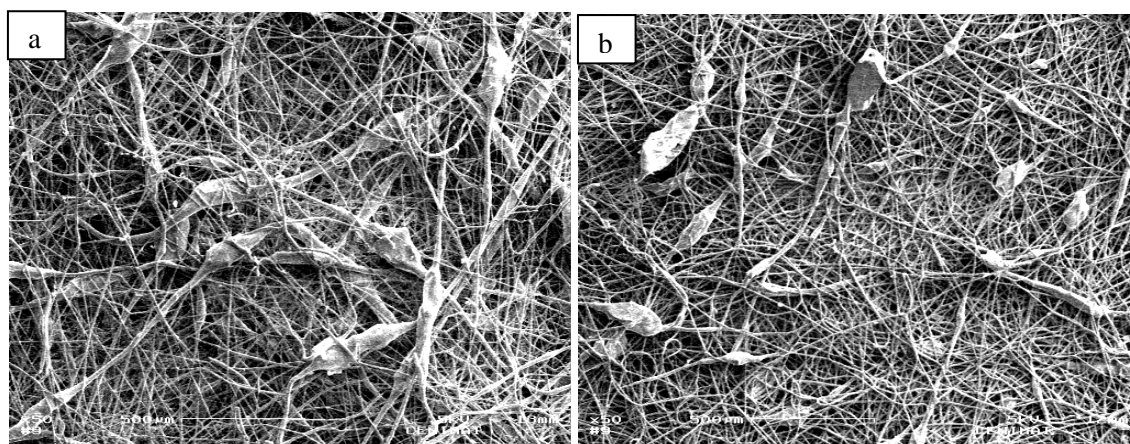


Figura 3.6 Imagens de SEM (ampliação 50x) das membranas 10%CS e 20%CS. (a) 10%CS; (b) 20%CS.

Como é visível, o quitosano, na forma de partículas ou grânulos, foi incorporado com sucesso em ambas as membranas. A maioria das partículas está embutida ou “encapsulada” nas fibras, não estando, por isso, exposta à superfície da fibra. Nestas duas imagens, não é perceptível o aumento da percentagem de quitosano de uma membrana para a outra. Isto poderá dever-se a uma escolha menos acertada das zonas de onde foram retiradas as imagens.

Observando as imagens da Figura 3.6, e sabendo a granulometria do CS utilizado (inferior a 100 μm), conclui-se que o quitosano está incorporado nas fibras sob a forma de aglomerados, e não de partículas individuais, uma vez que as zonas onde está o quitosano possuem dimensões superiores a 100 μm . Este facto poderá também dificultar a percepção do aumento da percentagem de quitosano.

Para avaliar o efeito do tratamento com NaOH 5 M na morfologia das fibras, foi obtida uma imagem de SEM de uma amostra da membrana 10% CS, previamente tratada (Figura 3.7). Ao comparar a Figura 3.6 (a) com a Figura 3.7, não é visível qualquer alteração na morfologia das fibras, pelo que se conclui que o tratamento não tem nenhum efeito na morfologia das fibras.

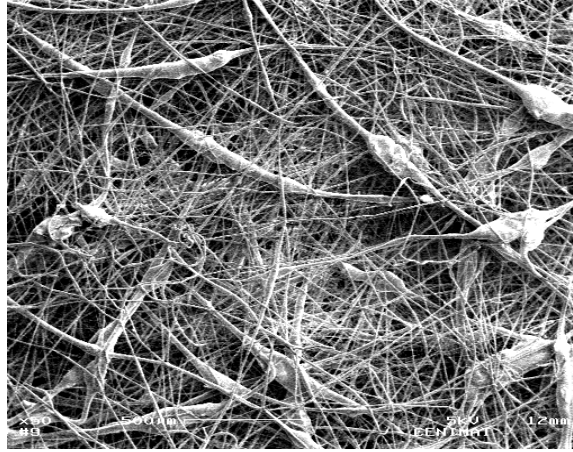


Figura 3.7 Imagem de SEM (ampliação 50x) da membrana 10% CS tratada com uma solução NaOH 5M, durante 2 horas.

3.2.2 Porosidade das membranas

Para determinar a porosidade das membranas, calculou-se primeiro a densidade aparente de cada amostra, recorrendo à equação 2.2. As medições efectuadas em amostras com, aproximadamente, $3,0 \text{ cm}^2$ de área e espessuras e (cm), tal que $V = 3,0 \times e \text{ (cm}^3\text{)}$, encontram-se registadas na Tabela 1 do Anexo 2. Recorrendo às equações 2.3 e 2.4, determinou-se a porosidade de cada amostra, cujos resultados se encontram na mesma tabela. A densidade ρ_{CS} foi determinada a partir de um filme de CS, com $0,0542 \text{ g}$ e $0,048 \text{ cm}^3$, tendo-se obtido o valor $\rho_{CS} = 1,129 \text{ g / cm}^3$.

Os valores da densidade da fase sólida, ρ_s , da densidade aparente, $\rho_{aparente}$, e da porosidade de cada membrana encontram-se na Tabela 3.1. A densidade aparente e a porosidade foram obtidas através da média das 5 réplicas utilizadas no estudo. Estes valores estão indicados na tabela como média \pm DP.

Tabela 3.1 Densidade aparente e porosidade das membranas produzidas.

| Membrana | $\rho_s \text{ / (g/cm}^3\text{)}$ | $\rho_{aparente} \text{ / (g/cm}^3\text{)}$ | $P \text{ (%)}$ |
|------------------------------|------------------------------------|---|-----------------|
| PCL $f_{CS/PCL} = 0$ | 1,145 | $0,22 \pm 0,02$ | 81 ± 2 |
| 10% CS $f_{CS/PCL} = 0,1$ | 1,144 | $0,22 \pm 0,02$ | 81 ± 2 |
| 20% CS $f_{CS/PCL} = 0,2$ | 1,142 | $0,21 \pm 0,02$ | 82 ± 2 |

Ao observar os resultados da Tabela 3.1, pode-se concluir que todas as membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS) são bastante porosas, apresentando porosidades estatisticamente semelhantes. A porosidade tende a aumentar com o aumento da percentagem de quitosano incorporado na membrana, sendo a membrana 20% CS a mais porosa de todas. Apesar da pequena diferença dos valores obtidos para a porosidade, as amostras com quitosano apresentam uma maior rugosidade superficial, sendo a de PCL mais suave ao toque, apresentando uma superfície lisa e uniforme.

O valor determinado experimentalmente para a densidade do CS, $\rho_{CS} = 1,129 \text{ g/cm}^3$, é inferior a alguns valores encontrados na literatura medidos por outros métodos. Este valor tem consequências nas porosidades, uma vez que é usado na equação 2.4 para o cálculo da densidade da fase sólida, ρ_s . Um valor de ρ_{CS} mais elevado resultaria em valores mais elevados de porosidade. [32]

3.3 Ângulos de contacto

Como o quitosano é um material hidrofílico, a medição dos ângulos de contacto das membranas teve como primeiro objectivo avaliar o efeito da incorporação de CS nas matrizes hidrofóbicas de PCL. Na Tabela 3.2 encontram-se os valores dos ângulos de contacto das três membranas (PCL, 10% CS e 20% CS), sem qualquer tratamento.

Tabela 3.2 Ângulos de contacto das três membranas produzidas.

| Membrana | Ângulo de contacto (Média \pm DP) |
|----------|-------------------------------------|
| PCL | 125 \pm 5 |
| 10% CS | 125 \pm 5 |
| 20% CS | 130 \pm 3 |

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a incorporação de quitosano nas membranas não produziu alterações significativas na hidrofiliidade das mesmas. Estes resultados podem ser explicados pelo facto do quitosano não estar exposto, ou seja, ao estar essencialmente “encapsulado” nas fibras de PCL, o quitosano não terá influência significativa na hidrofiliidade das membranas, que possuem, por isso, valores de ângulo de contacto semelhantes aos da membrana de PCL. Os ângulos de contacto obtidos para as membranas de

nanofibras de PCL estão de acordo com os valores encontrados na literatura para membranas semelhantes, que variam entre 120° e 130°. [6, 18, 33]

A pequena diferença nos valores de ângulo de contacto, nomeadamente entre a membrana 20% CS e as outras duas, apesar de não ser estatisticamente significativa, pode ser explicada pela morfologia da membrana, pois o ângulo de contacto também é dependente da rugosidade superficial e da porosidade da membrana. Por exemplo, as interações a nível atómico entre a água e o material podem ser mais intensas mas, por haver menos pontos de contacto da gota com a parte sólida da amostra, o ângulo de contacto pode aumentar. O número de pontos de contacto depende da superfície exposta de material e, consequentemente, da fracção superficial da amostra que é ar, isto é, depende da rugosidade e da porosidade. Ou seja, os ângulos de contacto podem sofrer alterações devido às características da superfície (mais ou menos rugosa) e não à maior ou menor hidrofiliabilidade do material. Sendo que a membrana 20% CS é mais rugosa e tem uma superfície mais irregular que as outras duas, os ângulos de contacto superiores podem dever-se à morfologia desta membrana. [33]

De seguida, avaliou-se o efeito do tratamento com NaOH nas três membranas.

Tabela 3.3 Ângulos de contacto antes e após tratamento (1 hora) com NaOH 5 M.

| Membrana | Ângulo de contacto (Média ± DP) | | Diminuição dos ângulos de contacto (%) |
|----------|---------------------------------|--------------------|--|
| | S/ tratamento NaOH | C/ tratamento NaOH | |
| PCL | 125 ± 5 | 95 ± 5 | 24 |
| 10% CS | 125 ± 5 | 73 ± 6 | 42 |
| 20% CS | 130 ± 3 | 108 ± 10 | 17 |

Como se pode ver pelos resultados apresentados na Tabela 3.3 e no gráfico da Figura 3.8, o tratamento com uma solução de NaOH 5 M durante 1 hora, produziu uma diminuição dos ângulos de contacto das três membranas e, por conseguinte, aumentou a hidrofiliabilidade das membranas. Este aumento da hidrofiliabilidade das membranas não é correlacionável com a percentagem de quitosano incorporado nas membranas, uma vez que o efeito do tratamento com NaOH terá sido mais eficaz na membrana com uma percentagem intermédia de quitosano (10% CS), como se pode ver na Figura 3.8 e na Tabela 3.3. Uma possível explicação para as variações de ângulo de contacto encontradas é a diferente eficácia dos tratamentos, devida a diferentes exposições do material das amostras à solução de NaOH. Desta forma, a morfologia da superfície será novamente um factor a ter em conta.

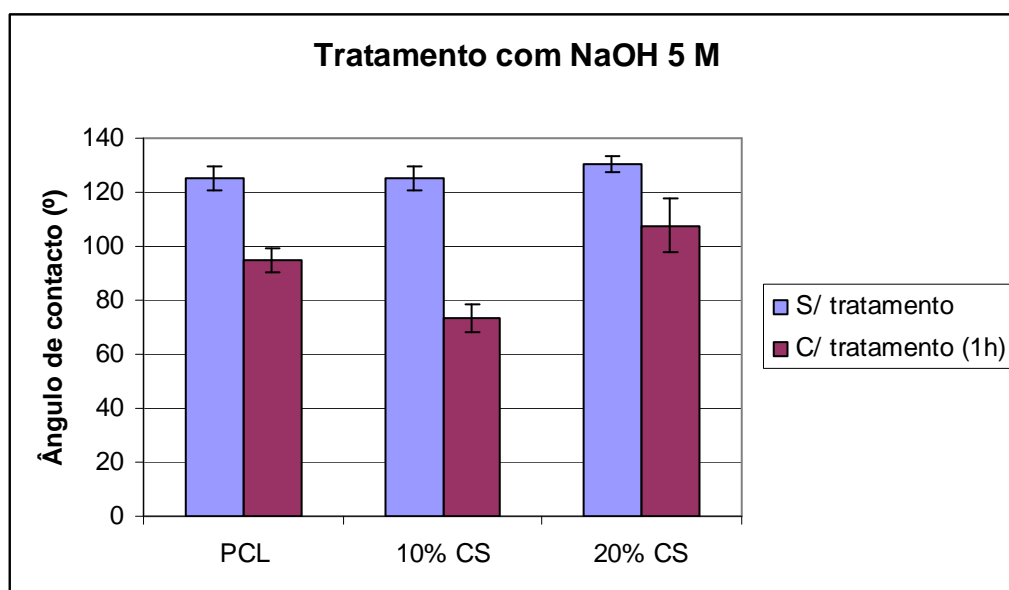


Figura 3.8 Diminuição dos ângulos de contacto com o tratamento NaOH 5 M.

Efectivamente, se admitirmos que uma parte significativa do quitosano está maioritariamente “encapsulado” nas fibras de PCL, os factores determinantes terão que ver com as características das membranas. Para além da rugosidade da superfície e porosidade da membrana, também a espessura das amostras utilizadas pode ter influência nas alterações do ângulo de contacto. Uma vez que o tratamento com NaOH é predominantemente superficial, o tratamento poderá ser mais eficaz em amostras de espessura menor, nas quais o efeito do tratamento se estenda praticamente a todo o volume (devido à maior proximidade das superfícies tratadas), promovendo uma maior capacidade de absorção de água. As amostras da membrana 10% CS utilizadas neste estudo poderiam ter uma espessura inferior às amostras de PCL e 20% CS, provocando uma maior diminuição nos ângulos de contacto.

Avaliaram-se também diferentes tempos de tratamento com NaOH na membrana 10% CS. Os resultados encontram-se na Tabela 3.4 e na Figura 3.9.

Tabela 3.4 Diferentes tempos de tratamento com solução NaOH 5 M na membrana 10% CS.

| Tempo de tratamento | Ângulo de contacto (Média ± DP) |
|---------------------|---------------------------------|
| S/ tratamento | 125 ± 5 |
| 30 minutos | 96 ± 6 |
| 60 minutos | 73 ± 6 |
| 120 minutos | 64 ± 13 |

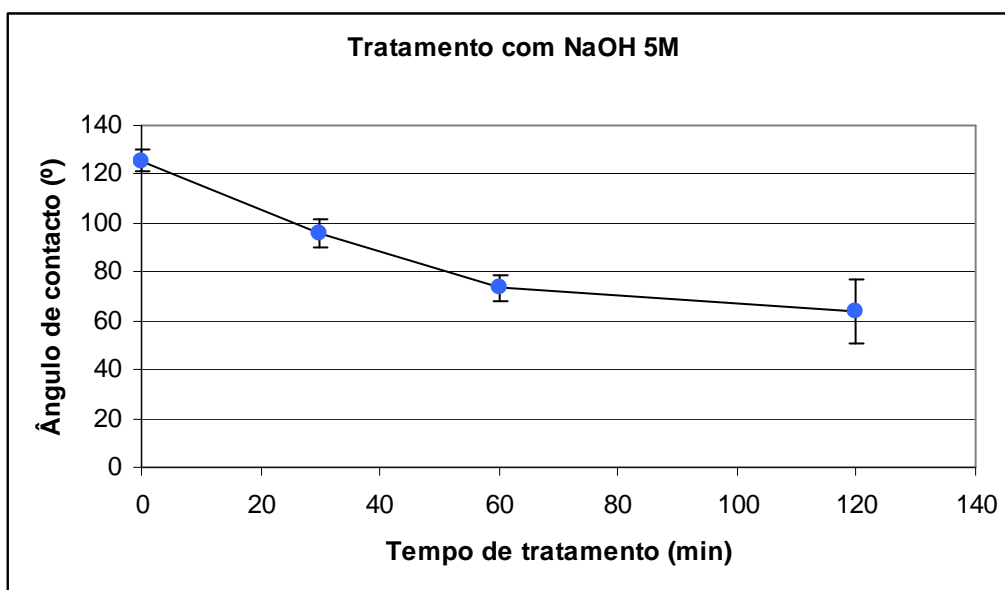


Figura 3.9 Diferentes tempos de tratamento com solução NaOH 5 M na membrana 10% CS.

Pela análise do gráfico da Figura 3.9, é visível que os valores de ângulo de contacto diminuem com o aumento do tempo de tratamento e que essa diminuição é cada vez menor. Verifica-se também que com o aumento do tempo de tratamento, a incerteza relativa (razão entre o DP e o valor médio) vai também aumentando. A maior variação de valores dos ângulos de contacto em amostras sujeitas a maiores tempos de tratamento pode dever-se ao facto das amostras, ou zonas das amostras, não terem sido afectadas de uma forma uniforme pelo tratamento com NaOH, pelo que ao aumentar o tempo de tratamento, também se aumenta a diferença de valores de ângulo de contacto.

Convém recordar que os valores de ângulo de contacto são resultados experimentais e podem estar, por isso, afectados por erros, quer por parte do operador, quer por parte do equipamento utilizado. Em particular, ao medir ângulos de contacto de membranas de nanofibras, muitas vezes é difícil definir na imagem do conjunto gota/matriz, capturada pela câmara, a interface entre a gota e a superfície da membrana quando esta é irregular, como é no caso destas membranas, principalmente nas que têm quitosano incorporado (10% CS e 20% CS). O *software* pode fazer esta detecção automaticamente ou, alternativamente, ela pode ser feita pelo operador. Quando a zona da interface fica mal definida, a tangente à gota é avaliada numa zona que não é a de contacto com a superfície e o ângulo de contacto é mal avaliado. As diferenças na avaliação da zona da interface levam a valores de ângulo de contacto que podem ser muito diferentes. No procedimento experimental optou-se por fazer esta avaliação manualmente.

Além da avaliação interface gota/matriz, outro passo importante na determinação da tangente e, conseqüentemente, do ângulo de contacto, é a análise da forma da gota. O perfil da gota é extraído automaticamente pelo *software* a partir da imagem capturada, podendo induzir erros. Quando o perfil é mal definido, a tangente à gota é mal determinada. Tendo consciência desta variação nos ângulos de contacto, compreende-se que pequenas variações nos ângulos de contacto medidos não permitem tirar conclusões quantitativas do tratamento com NaOH.

De uma forma geral, pode dizer-se que a incorporação de quitosano não produziu efeito no aumento da hidrofiliidade das membranas, mas tal foi conseguido com o tratamento com uma solução de NaOH 5 M. Analisando os diferentes tempos de tratamento e os efeitos dos mesmos, pode dizer-se que, nas condições em que o tratamento foi realizado, quando este é efectuado durante 1 hora já confere carácter essencialmente hidrofílico à membrana, pois reduz o ângulo de contacto a um valor inferior a 90°. Como se viu na secção de Materiais e Métodos (páginas 25 e 26), este é o limite de ângulo de contacto para o qual se considera que a superfície é hidrofílica (Figura 2.4). [34]

Dado que a hidrólise das ligações éster do PCL, responsável pelo aumento da hidrofiliidade, conduz à quebra das cadeias poliméricas, ao estender o tempo de tratamento poder-se-á estar a comprometer a estabilidade das membranas. Este foi um dos aspectos considerados nos ensaios de tracção.

3.4 Ensaios de tracção

A Figura 3.10 mostra as curvas de tensão-deformação das amostras da membrana de PCL. Todas as amostras exibiram um comportamento mecânico semelhante sob forças de tracção, característico de materiais dúcteis, apresentando uma zona de deformação elástica e uma zona de deformação plástica. No início das curvas (<10% deformação) ocorre um aumento proporcional da deformação com a tensão aplicada. Este comportamento elástico é descrito pela lei de Hooke, e corresponde a deformações que são essencialmente recuperáveis após a remoção da carga. [4]

Com o aumento da deformação, as curvas mostram um comportamento típico da ocorrência de deformação plástica, que persiste mesmo após a retirada das forças que a originaram. Todas as amostras sofreram uma grande deformação para os valores mais elevados de tensão aplicada, sem atingirem a ruptura durante o ensaio.

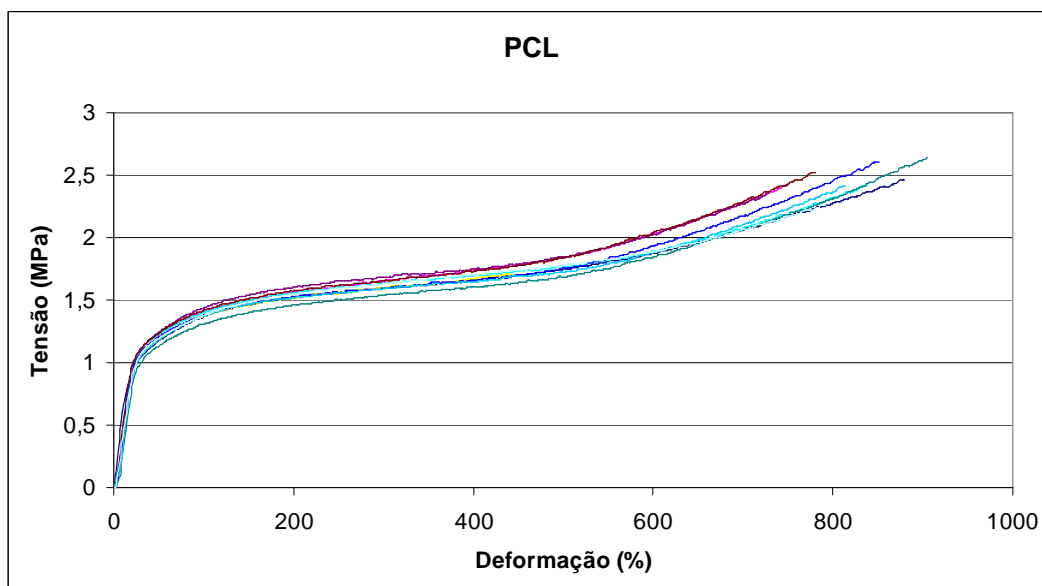


Figura 3.10 Curvas de tensão-deformação das amostras de PCL.

As amostras da membrana 10% CS, cujas curvas de tensão-deformação se encontram na Figura 3.11, exibiram um comportamento ligeiramente diferente da membrana de PCL. Apesar de obedecerem à lei de Hooke na parte inicial das curvas (<10% deformação), a partir deste ponto, o aumento da deformação não é sempre acompanhado de um crescimento da tensão. Depois de atingido um certo valor de tracção, para o qual a tensão exercida pela amostra nas garras é máxima, ocorre uma queda abrupta no valor desta grandeza, seguida de um decréscimo gradual. Para o valor máximo de deformação imposto durante os ensaios, não foi atingida a ruptura completa.

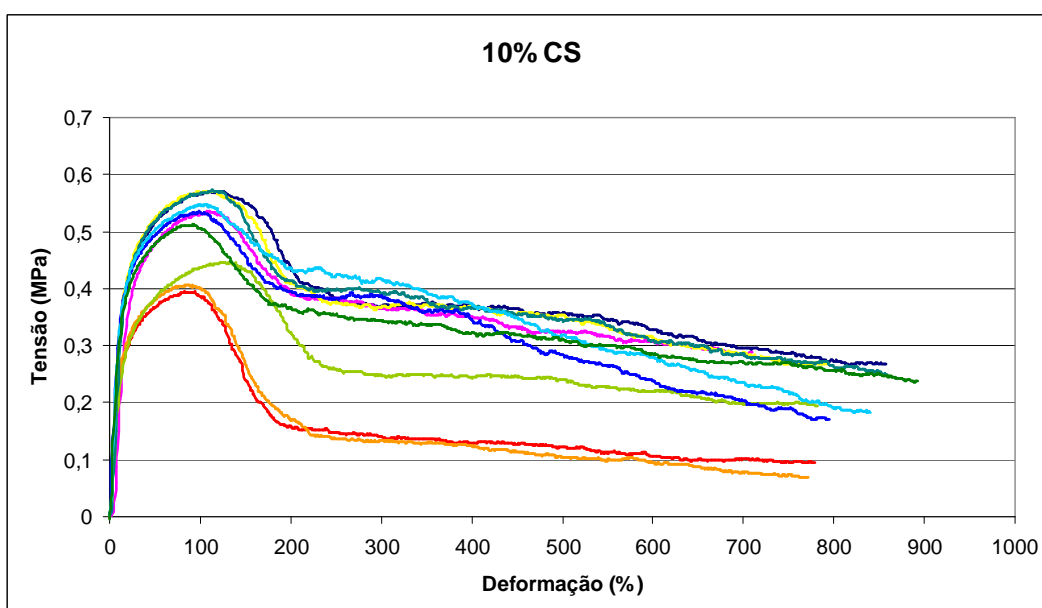


Figura 3.11 Curvas de tensão-deformação das amostras 10% CS.

Este comportamento pode ser explicado pela existência de dois tipos de fibras na membrana: as fibras de PCL e as fibras de PCL e quitosano. As fibras de PCL, semelhantes às que constituem a membrana PCL, terão um comportamento semelhante ao descrito pelas curvas de tensão-deformação desta membrana. As fibras de PCL e quitosano, por outro lado, conferem à membrana uma certa fragilidade, dada pelos seus diâmetros irregulares e a presença de partículas e grânulos de tamanhos variados. A queda abrupta dos valores de tensão, presente em todas as curvas das amostras 10% CS, poderá dever-se à ruptura das fibras de PCL e quitosano, mais frágeis que as fibras só de PCL. Por esta altura, as amostras ainda terão intactas as suas fibras de PCL, que evitam que a membrana sofra uma ruptura completa, como é visível na Figura 3.11.

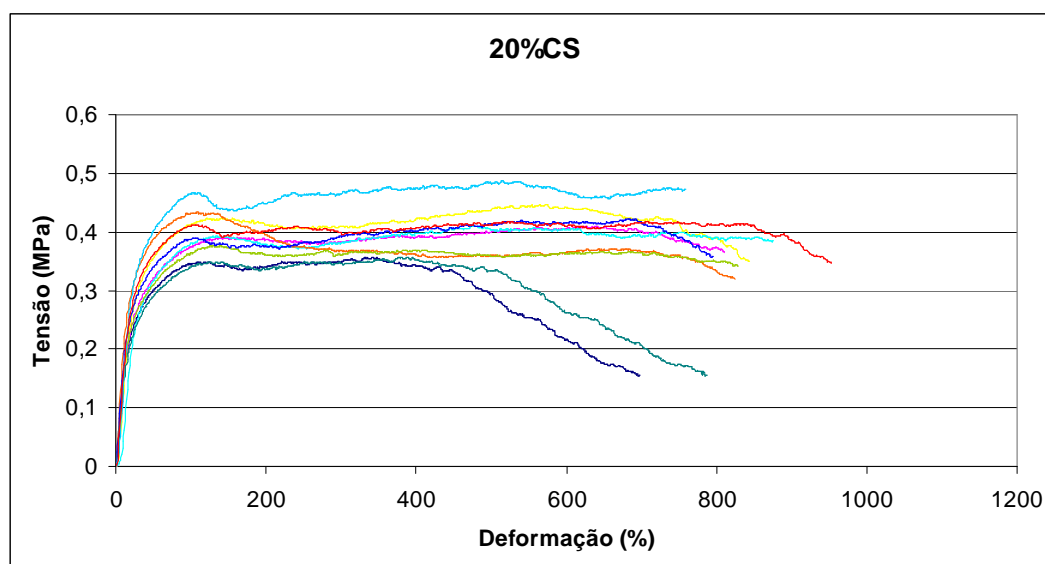


Figura 3.12 Curvas de tensão-deformação das amostras 20% CS.

As amostras da membrana 20% CS, cujas curvas de tensão-deformação se encontram na Figura 3.12, apresentaram um comportamento semelhante ao da membrana 10% CS, ao apresentarem uma tensão máxima seguida de uma descida no valor de tensão, com o aumento da deformação. Esta queda, apesar de não ser tão abrupta como no caso das amostras da membrana 10% CS, dever-se-á às mesmas razões, isto é, à existência de um tipo de fibras mais frágeis, as fibras de PCL e quitosano, que cedem à fractura. Tal como as outras duas membranas, também a membrana 20% CS apresenta um comportamento elástico, ou seja, uma proporcionalidade directa entre tensão aplicada e deformação, no início das curvas.

Os módulos de Young, ou módulos de elasticidade, das três membranas, obtidos a partir da média dos declives da porção linear das curvas de tensão-deformação, encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Módulos de Young das membranas.

| Membrana | Módulo de Young (MPa) – Média \pm DP |
|-----------------|--|
| PCL | $6,6 \pm 0,5$ |
| 10% CS | $3,2 \pm 0,5$ |
| 20% CS | $1,9 \pm 0,2$ |

A membrana PCL apresenta um módulo de Young de $6,6 \pm 0,5$ MPa. Este valor é semelhante aos valores encontrados na literatura para membranas de nanofibras de PCL, obtidas pela técnica de electrofiação. [4, 18] Os resultados da Tabela 3.5 mostram que o módulo de Young das membranas diminuiu com o aumento da percentagem de quitosano incorporado. Embora o seu significado preciso seja restrito à região de deformação linear, em geral podemos inferir, um pouco além desta região, que uma diminuição do módulo de elasticidade indica que a mesma deformação é atingida para valores mais baixos de tensão.

As figuras 3.11 e 3.12 mostram que o valor da resistência à tracção (tensão máxima que um material pode suportar ao ser alongado ou traccionado, dada pelo máximo das curvas de tracção) ocorre nas amostras 10% CS e 20% CS para uma deformação de 100%. Assim, a membrana 20% CS, com menor módulo de Young, atinge uma tensão máxima inferior à de 10% CS. A membrana 20% CS começa assim a ceder para um valor de tensão mais baixo, podendo concluir-se que quanto maior a quantidade de quitosano incorporado nas membranas, mais frágil será o seu comportamento e menor a sua resistência à tracção.

Durante a cirurgia, as membranas biodegradáveis para GBR/GTR são fixadas com a ajuda de pinos biodegradáveis, cola médica e suturas, impedindo o seu colapso nos defeitos ósseos. Por isso, torna-se necessário produzir membranas, destinadas a GBR/GTR, mecanicamente estáveis, de forma a evitar a sua ruptura durante a cirurgia. [6] Ao olhar para as figuras 3.10, 3.11 e 3.12, é visível que as membranas podem ser esticadas, ou traccionadas, até uma deformação de cerca de 800%, sem ocorrer a fractura ou ruptura das mesmas. Em relação à resistência à tracção das membranas, vem referido na literatura [6] que certas membranas produzidas para GBR possuem um valor de 0,017 MPa. Em comparação com este valor, considera-se que a resistência à tracção das três membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS) será suficiente quando utilizadas para GTR/GBR, uma vez que todas as membranas possuem valores de, pelo menos, 0,3 MPa, aproximadamente.

Tendo-se concluído que o tratamento com NaOH é benéfico do ponto de vista do aumento da adesão aos tecidos que proporcionará às membranas numa aplicação estomatológica, verificou-se seguidamente como as propriedades mecânicas das membranas seriam afectadas pelo tratamento com uma solução NaOH 5 M (durante 1 h) e pela esterilização com radiação gama.

A primeira avaliação foi feita com base na análise da forma das curvas de tracção. Os gráficos obtidos para as membranas PCL, 10% CS e 20% CS, após tratamento com NaOH e irradiação gama, foram semelhantes aos das figuras 3.10, 3.11 e 3.12, respectivamente, revelando que a forma das curvas não foi afectada pelos tratamentos (os resultados não são apresentados, pois são iguais aos apresentados anteriormente). Todas as membranas demonstraram um comportamento semelhante, isto é, formas de curvas idênticas antes e depois dos tratamentos. Em relação ao módulo de Young, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Módulos de Young das membranas antes e depois dos tratamentos.

| Membrana | Módulo de Young (MPa) – Média \pm DP | | |
|----------|--|--------------------|--------------------------------|
| | S/ tratamento | C/ tratamento NaOH | C/ tratamento NaOH e irradiada |
| PCL | 6,6 \pm 0,5 | - | 7,5 \pm 0,8 |
| 10% CS | 3,2 \pm 0,5 | 2,6 \pm 0,2 | 2,6 \pm 0,6 |
| 20% CS | 1,9 \pm 0,2 | - | 1,6 \pm 0,3 |

Analisando os resultados da Tabela 3.6 e da Figura 3.13, pode dizer-se que nenhum dos tratamentos, quer o tratamento com NaOH, quer a esterilização com radiação gama, influenciam significativamente as propriedades mecânicas das membranas, uma vez que os intervalos dos módulos de Young correspondentes a uma mesma membrana se sobrepõem. Posto isto, ambos os tratamentos serão viáveis, do ponto de vista mecânico, no caso de se pretender utilizar as membranas e garantir as suas boas condições de hidrofiliicidade e esterilização (embora se tenham usado as doses regulamentares para dispositivos médicos, a eficácia da esterilização tem sempre de ser sujeita a certificação realizando testes microbiológicos).

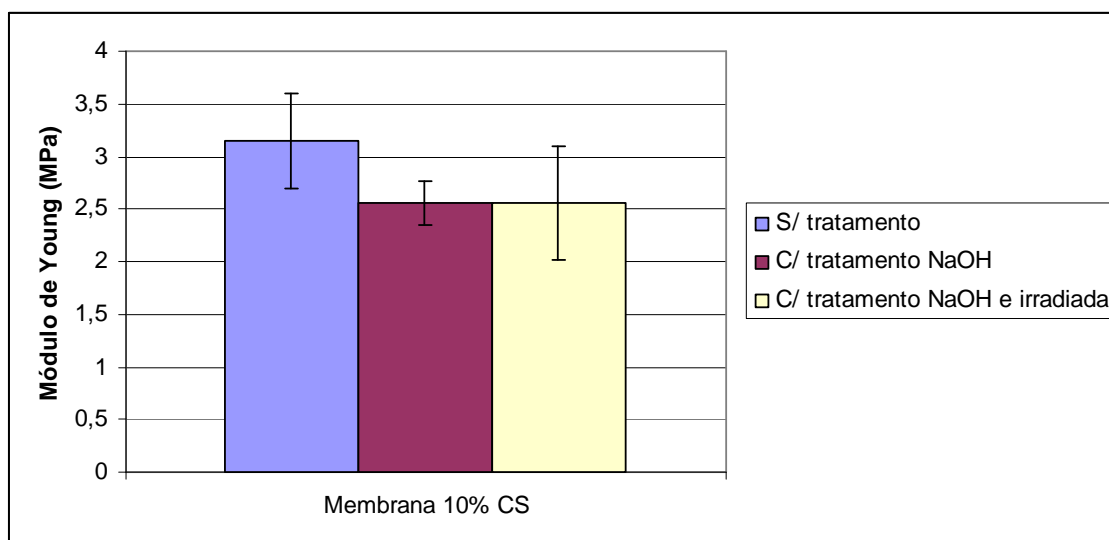


Figura 3.13 Módulos de Young da membrana 10% CS.

3.5 Testes de degradação

Tal como referido anteriormente, na secção de Materiais e Métodos, para cada condição foram utilizadas quatro réplicas, previamente tratadas com NaOH. Depois de calculada a perda de massa de cada amostra, obteve-se a média e o desvio padrão de cada conjunto de amostras, cujos valores se apresentam de seguida, na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 Perda de massa das membranas.

| Membrana | Condição | Perda de massa (%) – Média \pm DP | |
|----------|-----------------|-------------------------------------|----------------|
| | | 1 Semana | 1 Mês |
| PCL | Meio ácido | 0,3 \pm 0,6 | 0,3 \pm 0,5 |
| | pH fisiológico | 0,1 \pm 0,2 | 0,0 \pm 0,0 |
| | Meio enzimático | 1 \pm 2 | 0,0 \pm 0,0 |
| 20% CS | Meio ácido | 15,3 \pm 0,7 | 14,1 \pm 0,3 |
| | pH fisiológico | 0,1 \pm 0,3 | 0,0 \pm 0,0 |
| | Meio enzimático | 0,9 \pm 0,2 | 0,2 \pm 0,3 |

Analisando os resultados da Tabela 3.7, pode-se dizer que, entre as membranas testadas, a única degradação significativa se deu para a membrana 20% CS em meio ácido. No caso da membrana de PCL e da membrana 20% CS tanto em pH fisiológico como em meio enzimático, a perda de massa está entre os 0% e 1%, quer para o ensaio de 1 semana como para o ensaio de 1 mês, não sendo, por isso, significativa do ponto de vista da degradação.

A perda de massa da membrana 20% CS em meio ácido foi de cerca de 15% tanto ao fim de 1 semana como ao fim de 1 mês, não havendo aumento da perda de massa com o aumento do tempo de estudo. Uma vez que o quitosano se dissolve em meios ácidos, a perda de massa das amostras dever-se-á, essencialmente, à dissolução das partículas de quitosano contidas nas membranas (20% é a percentagem relativa à quantidade de PCL, pelo que a percentagem de CS na amostra é de cerca de 15%). Depois da dissolução do quitosano, a massa das amostras mantém-se constante, razão pela qual a perda de massa ao fim de 1 semana é semelhante à perda de massa ao fim de 1 mês. A dissolução do quitosano pode ser observada nas imagens de SEM da Figura 3.14, onde é visível que nas zonas onde inicialmente se via o quitosano “encapsulado” nas fibras de PCL (Figura 3.14 (a)), depois dos testes de degradação em meio ácido, estas zonas aparentam uma espécie de “casulos” vazios (Figura 3.14 (b)), onde permanece a estrutura exterior de PCL, mas o quitosano que anteriormente preenchia o interior desapareceu.

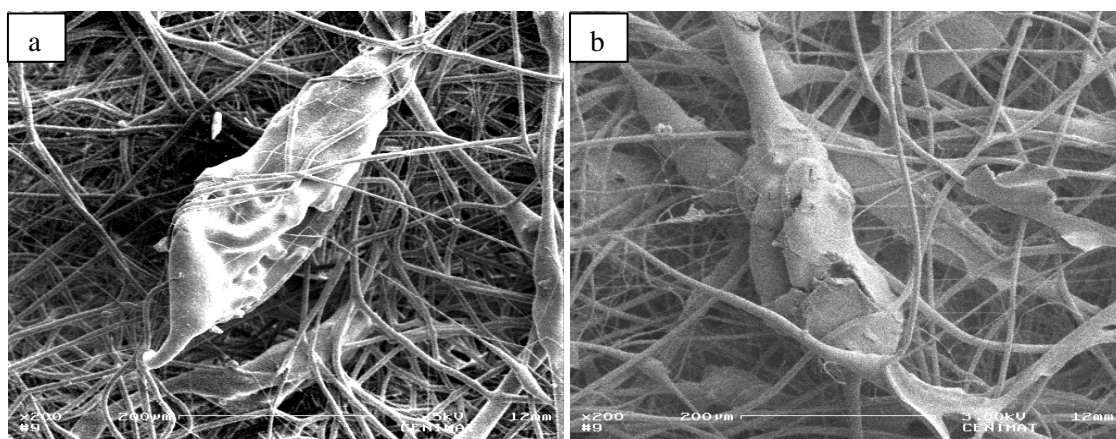


Figura 3.14 Imagens de SEM (ampliação 200x) da membrana 20% CS antes e depois dos testes de degradação. (a) Sem tratamento; (b) Após 1 semana em pH ácido.

A perda de massa em pH fisiológico foi praticamente nula para ambas as membranas. Este resultado já era expectável, uma vez que o CS não se dissolve nestas condições e resultados encontrados na literatura indicam que o PCL não sofre degradação numa solução tampão de fosfatos em períodos de 1 semana e 1 mês. [35-37]

A degradação das amostras em meio enzimático, quer da membrana de PCL quer da membrana 20% CS, foi, aparentemente, insignificante, uma vez que as perdas de massa foram praticamente nulas. Esta reduzida taxa de degradação dever-se-á ao facto da enzima só actuar actuar em subprodutos da hidrólise do PCL com baixo peso molecular ($M_n < 5000$). Mesmo quando as condições do teste proporcionam a formação de tais subprodutos (o que não é o caso), a diminuição da actividade enzimática com o tempo, que pode ser devida quer à

diminuição do *turnover* da enzima quer a fenómenos de inibição da enzima, pode levar a que a degradação enzimática não seja correctamente avaliada em testes realizados *in vitro*. [38]

Uma vez que não foram detectadas diferenças macroscópicas, isto é, a nível de perda de massa, foi feita uma caracterização morfológica por SEM, para tentar detectar alterações nas amostras de PCL (Figura 3.15). Observando as imagens da Figura 3.15 não são visíveis quaisquer alterações na morfologia das fibras ao fim de 1 mês de estudo, tanto em meio ácido como na solução enzimática.

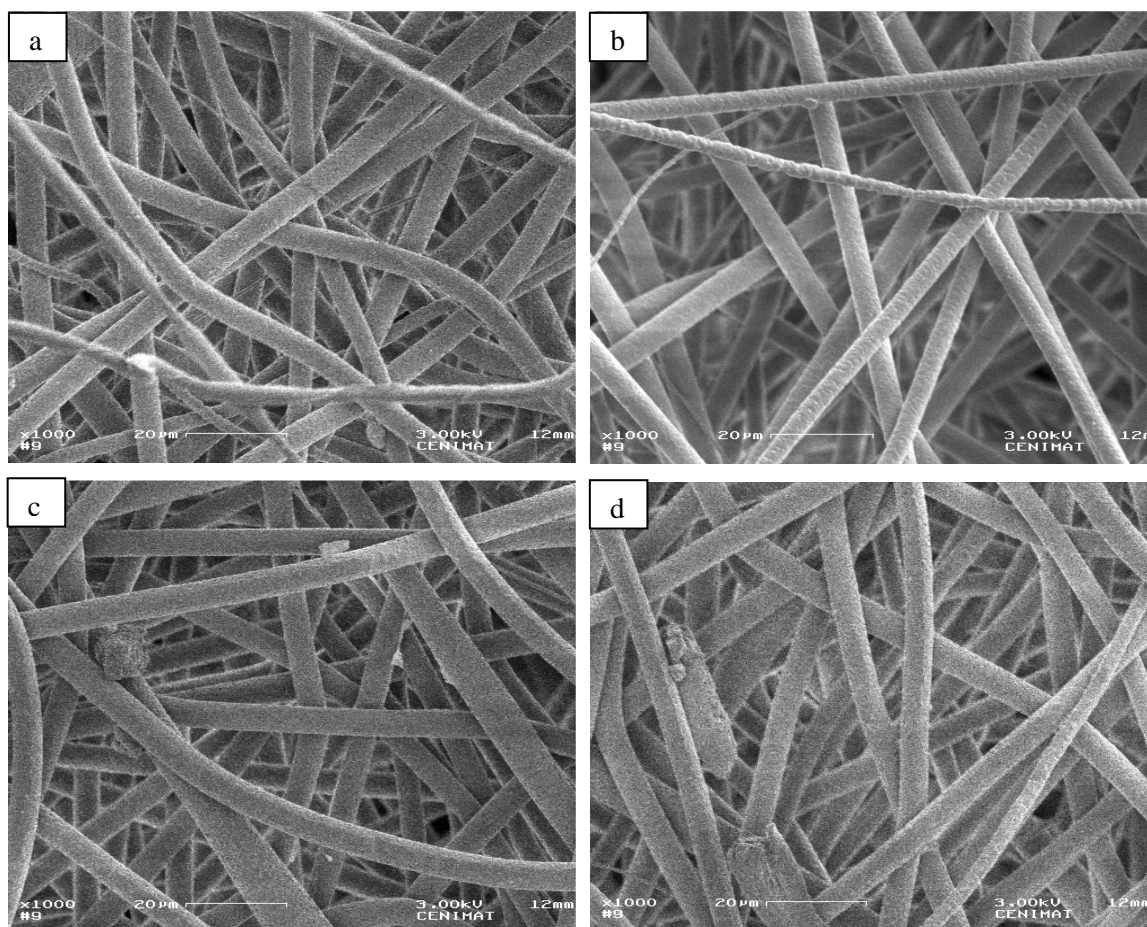


Figura 3.15 Imagens de SEM (ampliação 1000x) da membrana de PCL antes e depois dos testes de degradação. (a) Sem tratamento; (b) Tratada com uma solução NaOH 5 M; (c) Após 1 mês em pH ácido; (d) Após 1 mês em solução enzimática.

Para avaliar o efeito da esterilização com radiação gama na taxa de degradação das membranas, foi também utilizado um conjunto de amostras de PCL irradiadas, o qual foi colocado em meio enzimático durante os mesmos períodos de estudo: 1 semana e 1 mês. A escolha desta membrana prendeu-se com o facto de serem as fibras de PCL que conferem estrutura a todas as membranas. Estudando o efeito da radiação gama na taxa de degradação desta membrana, poder-se-á extrapolar os resultados para as outras duas (10% CS e 20% CS). Optou-se por estudar a degradação em meio enzimático, pois das três condições em estudo, esta seria a que mais especificamente poderia degradar as fibras de PCL, uma vez que é uma esterase.

Tabela 3.8 Influência da esterilização com radiação gama na taxa de degradação do PCL.

| Membrana | Tempo de estudo | Perda de massa (%) – Média \pm DP | |
|----------|-----------------|-------------------------------------|-----------|
| | | Não Irradiada | Irradiada |
| PCL | 1 semana | 1 ± 2 | 1 ± 2 |
| | 1 mês | $0,0 \pm 0,0$ | 2,04 * |

* Para este estudo foi apenas utilizada uma réplica, em vez de quatro, dada a falta de amostras irradiadas e a impossibilidade de se esterilizarem mais amostras.

Ao observar os resultados da Tabela 3.8 parece haver um ligeiro aumento da perda de massa com a irradiação, apesar de não ser estatisticamente significativo. Na literatura, encontra-se que a irradiação diminui significativamente a taxa de degradação do PCL em meio enzimático. [29] No entanto, o facto de se utilizarem poucas réplicas, especialmente no estudo de 1 mês, e os períodos de estudo serem bastante curtos, em comparação com os estudos descritos na literatura, pode levar a conclusões precipitadas. Para melhor avaliar o efeito da esterilização na degradação das membranas será necessário fazerem-se estudos de degradação por períodos mais prolongados, utilizando mais réplicas, e avaliar-se melhor o tipo de esterase a usar, escolhendo preferencialmente uma que esteja presente no meio oral.

3.6 Testes de bioactividade

Além das propriedades mecânicas e de uma taxa de degradação adequada, a capacidade de contribuir positivamente para a formação óssea poderá ser uma característica importante nestas membranas. Esta capacidade é avaliada através dos chamados testes de bioactividade, isto é, da análise de formação de cristais de apatite na superfície do material, durante a sua incubação em SBF com concentração de iões igual ao plasma de sangue humano, como descrito na secção Materiais e Métodos (página 31).

No caso da membrana de PCL podem ser vistos pequenos depósitos de apatite na superfície das fibras (identificáveis pelo seu aspecto rugoso), logo desde o primeiro tempo de estudo, isto é, a partir dos 5 dias de imersão em SBF (Figura 3.16 (a)). Estes depósitos tornaram-se mais evidentes quando o período de imersão aumentou, como se pode comprovar nas imagens dos restantes períodos de imersão: 10 dias, 20 dias e 30 dias, na Figura 3.16 (c), (e) e (g), respectivamente, principalmente a partir dos 20 dias.

Para avaliar o efeito do tratamento com NaOH na bioactividade das membranas, foram também colocadas amostras de PCL, previamente tratadas, nos mesmos períodos de imersão em SBF. O processo de deposição de apatite nas amostras da membrana de PCL tratadas com NaOH foi muito mais rápido, como se pode ver pelas imagens da Figura 3.16, (b), (d), (f) e (h). Ao fim de 10 dias, as fibras já se apresentavam mais cobertas do que a membrana de PCL, sem qualquer tratamento, ao fim de 30 dias. Estes resultados parecem demonstrar que o tratamento com NaOH favorece a formação de apatite na superfície das fibras, o que está de acordo com os estudos descritos na literatura. A formação de apatite geralmente não ocorre de forma espontânea na maioria dos polímeros sintéticos sem um pré-tratamento para activar as suas superfícies. Estudos recentes têm mostrado que o período necessário para a formação de apatite numa superfície de PCL, após imersão em SBF, pode ser sensivelmente reduzido com uma simples modificação da superfície do PCL, nomeadamente com um tratamento com uma solução aquosa de NaOH. [4, 39]

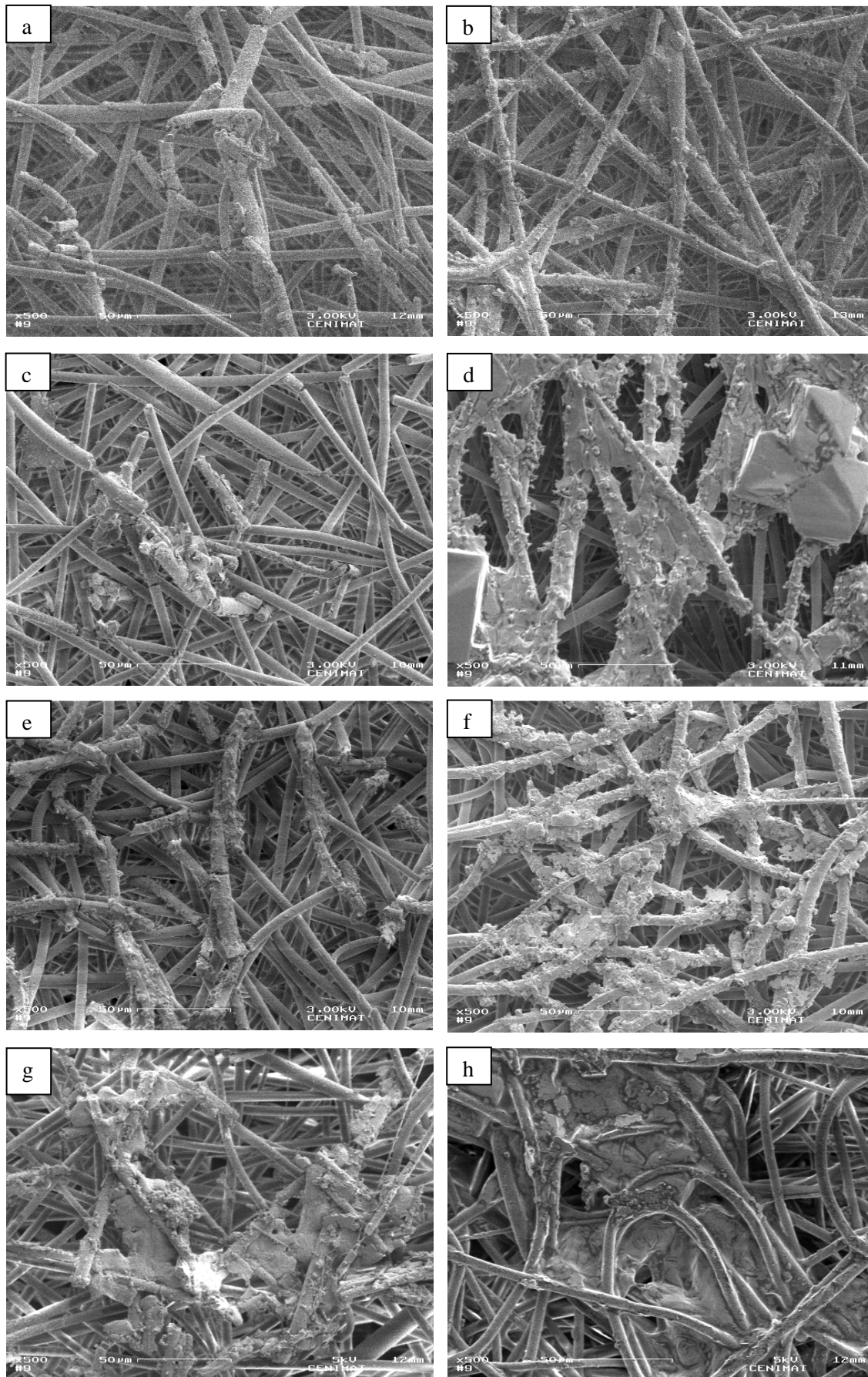


Figura 3.16 Imagens de SEM da membrana PCL (à esquerda) e da membrana PCL tratada com NaOH (à direita), após imersão em SBF. (a) e (b) 5 dias; (c) e (d) 10 dias; (e) e (f) 20 dias; (g) e (h) 30 dias.

As membranas 10% CS e 20% CS demonstraram um comportamento semelhante à membrana de PCL sem tratamento. Ao fim de 30 dias em SBF, ambas as membranas aparentavam ter deposições de apatite que cobriam parcialmente algumas fibras das membranas, como se pode ver nas imagens da Figura 3.17.

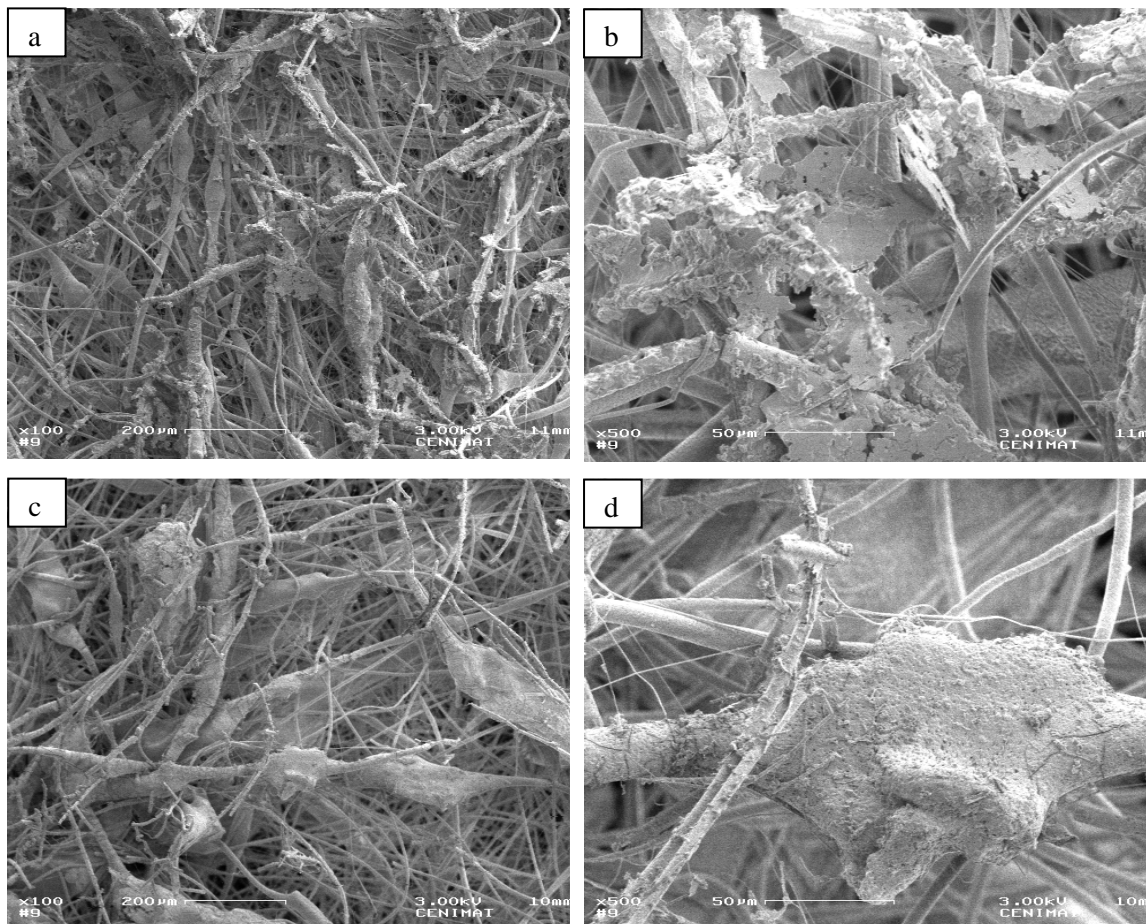


Figura 3.17 Imagens de SEM das membranas 10% CS (em cima) e 20% CS (em baixo), após 30 dias de imersão em SBF. (a) 10% CS, ampliação 100x; (b) 10% CS, ampliação 500x; (c) 20% CS, ampliação 100x; (d) 20% CS, ampliação 500x.

Todas as membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS) demonstram uma bioactividade mínima, apresentando deposições de apatite, ainda que em pequena quantidade, na superfície das fibras. Contudo, esta bioactividade pode ser melhorada com um pré-tratamento das superfícies com uma solução de NaOH.

3.7 Culturas celulares

Tal como referido anteriormente, na secção 2.10, realizaram-se testes de cultura celular nas três membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS), com o objectivo principal de se avaliar a adesão celular às mesmas. Estes testes permitem prever o comportamento que as

células terão quando estas membranas forem implantadas *in vivo* e avaliar uma possível rejeição das membranas.

Na Figura 3.18 podem ver-se as imagens de microscopia confocal de fluorescência, contraste de fase e a sobreposição das anteriores, para as três membranas, após uma cultura de 24h. As células podem ser reconhecidas pela sua coloração verde nas imagens de fluorescência.

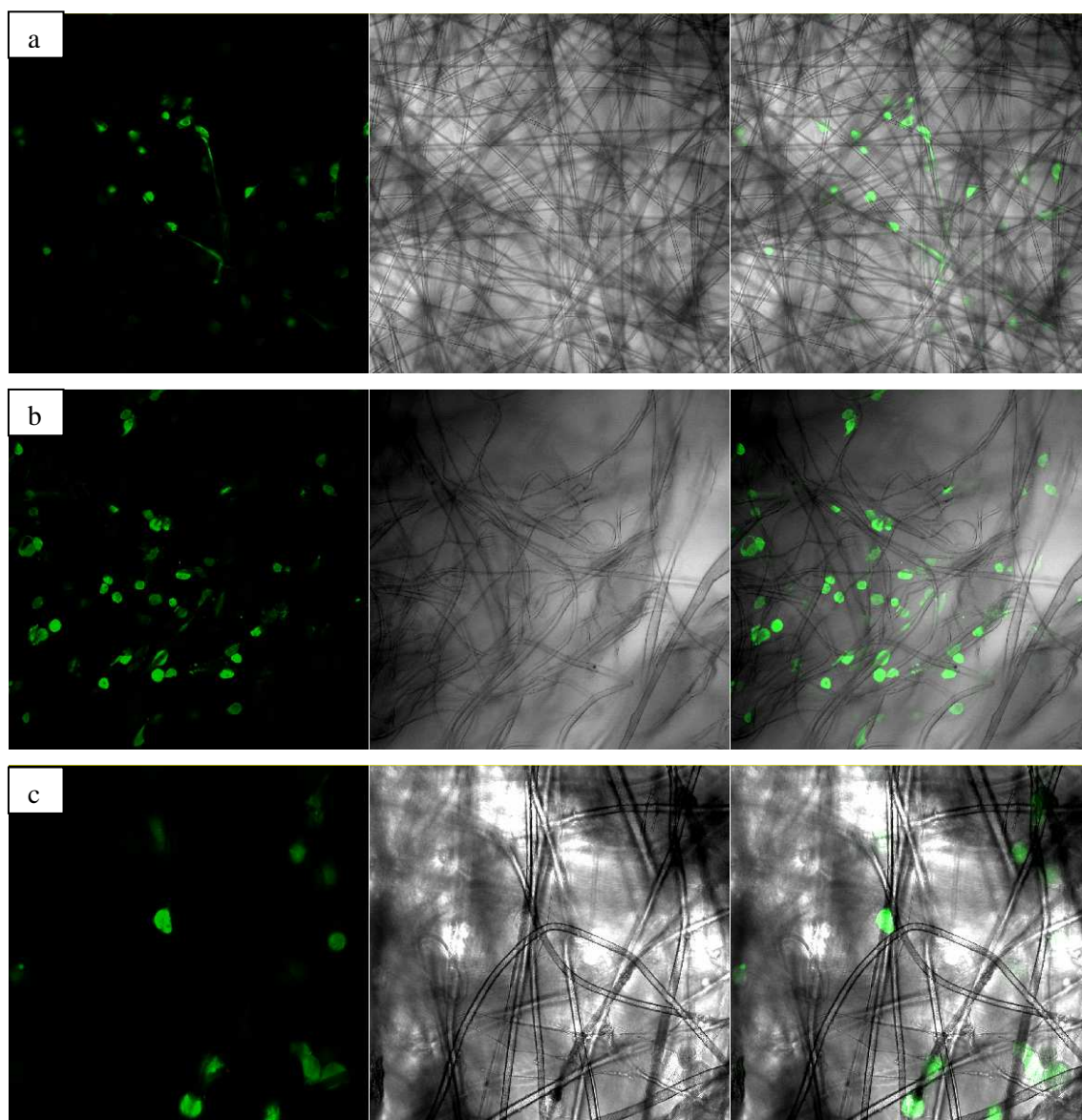


Figura 3.18 Imagens de microscopia confocal de fluorescência (esquerda), de contraste de fase (meio) e de sobreposição (direita) das culturas celulares nas membranas. (a) PCL; (b) 10% CS; (c) 20% CS.

Observando as imagens, pode dizer-se que ocorreu adesão celular em todas as membranas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, para membranas semelhantes. [4, 6] Outro aspecto a apontar é o facto de, aparentemente, o quitosano não ter qualquer influência na promoção de adesão celular, uma vez que todas as membranas parecem

ter resultados semelhantes. Isto pode dever-se ao facto do quitosano estar encapsulado nas fibras e não exposto.

Estes resultados, ainda que preliminares, demonstram uma boa adesão das células às membranas, mostrando que a hipótese de rejeição após o implante será bastante reduzida.

4 Conclusões e Perspectivas futuras

Este trabalho tinha como principal objectivo a produção de membranas biodegradáveis de PCL e quitosano CS para aplicação estomatológica e a sua caracterização física e biológica. Estas membranas destinam-se essencialmente a tratamentos de regeneração tecidual guiada (GTR) e regeneração óssea guiada (GBR).

Depois de efectuados diversos testes, de forma a optimizar os parâmetros de produção, foram produzidas com sucesso três membranas, de PCL e PCL com quitosano (10% CS e 20% CS), utilizando a técnica de electrofiação. A partir das imagens de SEM, pôde-se analisar a morfologia das fibras e confirmar que o quitosano foi incorporado nas membranas sob a forma de partículas. A incorporação de quitosano não produziu efeito na desejável diminuição da hidrofobicidade das membranas. Uma vez que o PCL é um material extremamente hidrofóbico, a adesão dos tecidos circundantes à membrana será difícil, não contribuindo para a sua estabilização. A normal circulação de fluidos nos tecidos também será afectada por este facto. Foi possível contornar este problema através de um tratamento com uma solução de NaOH 5 M, que foi eficaz no aumento da hidrofilicidade das membranas, reduzindo significativamente os valores de ângulo de contacto.

Para testar as propriedades mecânicas das membranas, foram realizados ensaios de tracção. Concluiu-se que a incorporação de quitosano afectou as propriedades mecânicas das membranas, sendo que o módulo de Young diminuiu com o aumento da percentagem de quitosano. No entanto, devido ao método de produção desenvolvido, utilizando duas seringas em simultâneo, de forma a ter dois tipos de fibras, todas as membranas possuem uma elevada extensão à ruptura. As membranas produzidas podem ser esticadas, ou traccionadas, até uma deformação de cerca de 800%, sem ocorrer a fractura ou ruptura completa das mesmas, o que as torna adequadas aos procedimentos cirúrgicos realizados em tratamentos de GTR/GBR. Verificou-se ainda que nem o tratamento com NaOH nem o processo de esterilização com radiação gama normalizado para dispositivos médicos afecta significativamente as propriedades mecânicas das membranas. O processo de esterilização usado deve ainda ser sujeito a testes de certificação para eventual reavaliação.

De forma a avaliar a taxa de degradação das membranas em meio oral e a sua influência num processo de formação óssea, foram realizados testes de degradação em meios simulados e testes de bioactividade em SBF.

Os testes de degradação mostraram uma perda de massa praticamente nula ao fim de 1 mês de estudo para todas as membranas e condições testadas, excepto no que diz respeito às membranas de PCL e quitosano em meio ácido (pH=3,74). No entanto, uma vez que os níveis de pH na boca nunca atingem estes valores, e analisando os resultados para as outras condições de estudo (pH fisiológico e solução enzimática), pode-se concluir que as membranas se manterão estáveis, conservando a sua estrutura, por um tempo mínimo de 1 mês. De futuro, seria interessante fazer estudos de degradação por períodos mais longos, de forma a acompanhar o processo de degradação das membranas, e também realizar ensaios de tracção depois dos testes de degradação, para analisar a evolução das suas propriedades mecânicas.

Os testes de SBF revelaram que todas as membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS) possuem uma certa bioactividade, verificada pela formação de apatite na superfície das fibras. Nas membranas sem qualquer tipo de tratamento, esta bioactividade é muito reduzida. No entanto, verificou-se que a bioactividade das membranas melhorava com um tratamento com NaOH, aumentando a formação de apatite.

O último passo neste trabalho passou pela realização de culturas celulares, para as quais foram utilizadas células epiteliais neoplásicas com auto-fluorescência (MCF-7/GFP). Verificou-se que ocorreu adesão celular nas três membranas produzidas. De futuro, as membranas deverão ser testadas utilizando diferentes tipos de células, por exemplo, fibroblastos gengivais, fibroblastos do ligamento periodontal e células osteoblásticas, para avaliação da resposta celular (adesão, proliferação e migração) das células do meio a que se destinam as membranas.

Futuramente poderão estudar-se novas formas de incorporação do quitosano, ou outras substâncias, nas membranas ou mesmo o dimensionamento de uma membrana de camada dupla, utilizando as membranas de PCL e quitosano do lado da gengiva, aliadas a uma membrana mais bioactiva do lado do osso. Uma membrana para aplicações de GTR/GBR capaz de promover um crescimento mais rápido do osso de um lado, enquanto impede a infiltração de tecido epitelial e conjuntivo da gengiva para o defeito ósseo e a colonização por bactérias de outro lado, seria única e altamente eficaz quando implantada *in vivo*. Um passo final necessário será a realização de testes *in vivo*.

Bibliografia

- [1] Chen, F.M., Jin, Y., *Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities*, Tissue Engineering: Part B, 2010, Vol. 16, No. 2.
- [2] Bottino, M.C., Thomas, V., Janowski, G.M., *A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration*, Acta Biomater., 2010.
- [3] Inion, *Dental: Guided Tissue Regeneration Membrane* [Online], 2006, http://www.inion.com/patienteducation/dental/en_GB/Patient_education_dental/_files/75429867635016010/default/Patient%20information%20dental.pdf [descarregado em 2011-06-20]
- [4] Yang, F. et al, *Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application*, Acta Biomater., 2009, Vol. 5, 3295-3304.
- [5] Stavropoulos, F., Dahlin, C., Ruskin, J.D., Johansson, C., *A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model.*, Clin. Oral Impl. Res., 2004, Vol. 15, 435–442.
- [6] Fujihara, K., Kotakib, M., Ramakrishna, S., *Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers*, Biomaterials, 2005, Vol. 26, 4139–4147.
- [7] W. L. Gore & Associates, *GORE-TEX® Regenerative Membrane* [Online], <http://www.goremedical.com/regenmembrane>
- [8] Lifecore Biomedical, *TEFGEN™ Regeneration Membranes* [Online], 2007, http://www.lifecore.com/Portals/0/PDFs/catalog-pdfs/TefGen%20QA_9-07.pdf [descarregado em 2011-06-20]
- [9] Luitpold Pharmaceuticals, *Bio-Gide® Resorbable Bilayer Membrane – Periodontists Oral & Maxillofacial Surgeons* [Online], 2009, <http://www.osteohhealth.com/BioGide.aspx>
- [10] Guidor, *GUIDOR® Bioresorbable Matrix Barrier for Bone Regeneration and Augmentation* [Online], <http://www.guidor.com/home-dental-professionals/guidor%C2%AE-bioresorbable-matrix-barriers-for-oral-surgery.aspx>
- [11] Cerrai, P. et al, *Periodontal membranes from composites of hydroxyapatite and bioresorbable block copolymers*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1999, Vol. 10, 677-682.
- [12] Aps, J.K.M., Martens, L.C., *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva*, Forensic Science International, 2005, Vol. 150, 119–131.
- [13] de Almeida, P.D.V., Grégio, A.M.T., Machado, M.A.N., de Lima, A.A.S., Azevedo, L.R., *Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review*, J Contemp Dent Pract, 2008, Vol. 9, No. 3, 72-80.
- [14] Finer, Y., Santerre, J.P., *Salivary Esterase Activity and Its Association with the Biodegradation of Dental Composites*, J Dent Res, 2004, Vol. 83, No. 1, 22-26.
- [15] Li, D., Xia, Y., *Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel*, Advanced Materials, 2004, Vol. 16, No. 14.

- [16] Henriques, C., Vidinha, R., Botequim, D., Borges, J.P., Silva, J.A.M.C., *A systematic study of solution and processing parameters no nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus*, J. Nanoscience and Nanotechnology, 2008, Vol. 8, No. 12.
- [17] Burger, C., Hsiao, B.S., Chu, B., *Nanofibrous materials and their applications*, Annu. Rev. Mater. Res. 2006, 36: 333-68.
- [18] Gomes, S., Anacleto, P., Henriques, C., Borges, J.P., Silva, J.C., *Electrospinning poly(ϵ -caprolactone) from acetic acid solutions for tissue engineering applications*, 2010.
- [19] Reneker, D.H., Yarin, A.L., *Electrospinning jets and polymer nanofibers*, Polymer, 2008, Vol. 49, 2387-2425.
- [20] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S., *Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*, Materials Science and Engineering C, 2010, Vol. 30, 1129–1136.
- [21] Roohani-Esfahani, S.I., Nouri-Khorasani, S., Lu, Z., Appleyard, R., Zreiqat, H., *The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites*, Biomaterials, 2010, Vol. 31, 5498-5509.
- [22] Labet, M., Thielemans, W., *Synthesis of polycaprolactone: a review*, Chem. Soc. Rev., 2009, Vol. 38, 3484-3504.
- [23] Alves, S.S., *Síntese de poli(ésteres-uretanas) à base de polióis de poli(hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona)*, 2008, Dissertação – Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- [24] Ravi Kumar, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive & Functional Polymers, 2000, Vol. 46, 1–27.
- [25] Sales de Assis, A., Montenegro Stamford, T.C., Montenegro Stamford, T.L., *Bioconversão de resíduos de camarão Litopenaeus Vannamei (Booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana*, Revista Iberoamericana de Polímeros, 2008, Vol. 9, No. 5.
- [26] Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Prog. Polym. Sci., 2006, Vol. 31, 603–632.
- [27] Yang, B. et al, *Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold*, Carbohydrate Polymers, 2010, Vol. 80, 860–865.
- [28] Chen, F., Lee, C.N., Teoh, S.H., *Nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning*, Materials Science and Engineering C, 2007, Vol. 27, 325–332.
- [29] Cottam, E. et al, *Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material*, Medical Engineering & Physics, 2009, Vol. 31, 221–226.
- [30] Belchior, A.L.V., *Contributo para um sistema de automação e robótica na fonte experimental de ^{60}Co /ITN – Distribuição de dose por simulação Monte Carlo e sua validação por dosimetria física e química*, 2007, Dissertação – Departamento de Física, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

- [31] Jalota, S., Bhaduri, S.B., Cuneyt Tas, A., *Using a synthetic body fluid (SBF) solution of 27 mM HCO₃⁻ to make bone substitutes more osteointegrative*, Materials Science and Engineering C, 2008, Vol. 28, 129–140.
- [32] Lao, L., Tan, H., Wang, Y., Gao, C., *Chitosan modified poly(l-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, Vol. 66, 218–225.
- [33] Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T.R., Dalton, P.D., Hutmacher, D.W., *Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review*, J. Mater. Chem., 2011, Vol. 21, 9419.
- [34] Förch, R., Schönherr, H., Jenkins, A.T.A., *Surface design: applications in bioscience and nanotechnology*, 2009, Wiley-VCH, p. 471.
- [35] Tay, F.R. et al, *Susceptibility of a Polycaprolactone-Based Root Canal Filling Material to Degradation. II. Gravimetric Evaluation of Enzymatic Hydrolysis*, JOE, 2005, Vol. 31, No. 10.
- [36] Hwang, Y., Ree, M., Kim, H., *Enzymatic degradation of poly(propylene carbonate) and poly(propylene carbonate-co-ε-caprolactone) synthesized via CO₂ fixation*, Catalysis Today, 2006, Vol. 115, 288–294.
- [37] Peña, J. et al, *Long term degradation of poly(ε -caprolactone) films in biologically related fluids*, Polymer Degradation and Stability, 2006, Vol. 91, 1424–1432.
- [38] Lam, C.X.F., Savalani, M.M., Teoh, S.H., Hutmacher, D.W., *Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions*, Biomed. Mater., 2008, Vol. 3, 034108 (15pp).
- [39] Oyane, A. et al, *Simple surface modification of poly(ε -caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid*, Biomaterials, 2005, Vol. 26, 2407–2413.

Anexo 1

Protocolo para passagem de células aderentes:

- 1) Aspirar o meio velho
- 2) Adicionar 5ml de tripsina e distribuir uniformemente por cima das células
- 3) Incubar cerca de 5 minutos na estufa (37 °C e 5 % CO₂), até as células se soltarem
- 4) Adicionar 5ml de meio para neutralizar a tripsina e aspirar com a pipeta o volume total para um tubo de centrifuga de 50ml
- 5) Centrifugar 5 minutos a 500g (500 vezes maior que a aceleração gravitacional da Terra)
- 6) Desprezar o sobrenadante (aspirar)
- 7) Adicionar 2ml de meio fresco ao *pellet*
- 8) Ressuspender com uma pipeta P1000
- 9) Adicionar 20ml de meio fresco aos frascos de cultura
- 10) Adicionar 50µl de células ressuspensas aos frascos de cultura
- 11) Incubar a 37 °C com 5% CO₂

Nota: Para a preparação da suspensão celular, executar o procedimento anterior apenas até ao ponto 8 (inclusive).

Contagem de células viáveis:

- 1) A *eppendorfs* de 1,5ml adicionar 50µl células (suspensão celular) + 100µl azul *Trypan* + 350µl PBS para a contagem no hemocitómetro
- 2) Contar células viáveis e determinar os volumes para a sementeira na placa

A contagem foi feita a partir de uma média de células vivas, representada por x na seguinte equação:

$$C = x \times 10^4 \times 10$$

Nota: A profundidade da câmara do hemocitómetro é 0,1mm e, portanto, como a superfície onde é efectuada a contagem das células é 1mm², o volume é 0,1mm³, que corresponde a 10⁻⁴ ml.

O x é multiplicado por 10⁴, expressando o número de células num mililitro da suspensão corada. O factor de diluição presente é 10 pois na *eppendorf* existem 50µl de células em 500µl

de solução, ou seja, um factor de diluição de 1 para 10. O C é assim uma concentração que expressa o número de células em 1ml da suspensão celular, isto é, 1 ml do frasco de cultura de onde se retiraram as células.

A partir desta concentração obteve-se o volume de suspensão celular que é necessário diluir em meio fresco, de modo a obter uma solução contendo 5×10^4 células/ml.

Anexo 2

Na Tabela 1 encontram-se as medições das amostras, com, aproximadamente, $3,0 \text{ cm}^2$ de área e espessuras e (cm), utilizadas nos cálculos da porosidade das membranas produzidas (PCL, 10% CS e 20% CS).

Tabela 1 Medições referentes às amostras utilizadas nos cálculos das porosidades.

| Membrana | $\rho_s / (\text{g/cm}^3)$ | Amostra | e / cm | m / g | $\rho_{\text{aparente}} / (\text{g/cm}^3)$ | $P (\%)$ |
|-------------------------------------|----------------------------|---------|-----------------|----------------|--|----------|
| PCL $f_{\text{CS/PCL}} = 0$ | 1,145 | 1 | 0,0153 | 0,0099 | 0,2157 | 81,17 |
| | | 2 | 0,0153 | 0,0095 | 0,2070 | 81,93 |
| | | 3 | 0,0097 | 0,0071 | 0,2440 | 78,70 |
| | | 4 | 0,0157 | 0,0105 | 0,2229 | 80,54 |
| | | 5 | 0,0150 | 0,0097 | 0,2156 | 81,18 |
| 10% CS $f_{\text{CS/PCL}} = 0,1$ | 1,144 | 1 | 0,0257 | 0,0169 | 0,2192 | 80,84 |
| | | 2 | 0,0250 | 0,0167 | 0,2227 | 80,53 |
| | | 3 | 0,0277 | 0,0190 | 0,2286 | 80,01 |
| | | 4 | 0,0253 | 0,0151 | 0,1989 | 82,61 |
| | | 5 | 0,0260 | 0,0161 | 0,2064 | 81,95 |
| 20% CS $f_{\text{CS/PCL}} = 0,2$ | 1,142 | 1 | 0,0210 | 0,0132 | 0,2095 | 81,66 |
| | | 2 | 0,0217 | 0,0147 | 0,2258 | 80,23 |
| | | 3 | 0,0230 | 0,0140 | 0,2029 | 82,24 |
| | | 4 | 0,0227 | 0,0128 | 0,1880 | 83,55 |
| | | 5 | 0,0227 | 0,0145 | 0,2129 | 81,36 |